

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Genetika, molekulární biologie a virologie



Bc. Kamila Horáčková

Příprava a využití systému pro studium regulace genové
exprese kvasinkových lineárních cytoplasmatických plasmidů

Preparation and validation of a system for the study of
regulation of gene expression of yeast linear cytoplasmic plasmids

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: Mgr. Václav Vopálenský, Ph.D.

Praha, 2021

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 11. 8. 2021

.....
Bc. Kamila Horáčková

Poděkování

Na tomto místě bych chtěla poděkovat svému školiteli Mgr. Václavu Vopálenskému, Ph.D. nejen za vedení mé práce, ale především za čas mně věnovaný, za cenné rady a velkou trpělivost. Rovněž bych chtěla poděkovat všem členům Laboratoře biochemie RNA, kteří přispívali radami při práci v laboratoři a za vytvoření příjemného prostředí. Dík patří i mé rodině, která mě po celou dobu studií velmi podporovala.

ABSTRAKT

O translaci lineárních cytoplasmatických plasmidů vyskytujících se u kvasinky *Kluyveromyces lactis* existují pouze velmi kusé informace. V současné době je poměrně dobře prozkoumán jejich transkripční aparát i celý transkriptom. Studium transkriptů lineárních plasmidů odhalilo velmi netypické uspořádání jejich 5' konců, které obsahují netemplátovou polyadenylaci a postrádají N⁷ methylguanosinovou čepičku. Právě přítomnost této struktury na 5' konci plasmidů specifických mRNA vyvolalo otázku iniciace translace.

Tato práce se zabývala přípravou reportérového systému vhodného pro studium vlivu počtu netěmplátově přidaných adenosinů na 5' konec mRNA lineárních plasmidů. Prvním krokem byla konstrukce duálního kvasinkového plasmidu nesoucího dva reportérové geny pod kontrolou dvou různých promotorů. Po jeho úspěšné konstrukci byla měřena aktivita promotorů TEF1 a PGK1, kdy se promotor TEF1 ukázal cca dvakrát silnější. Rovněž byl stanoven transkripční start obou promotorů. Druhým krokem byla konstrukce reportérového systému rovnou v kvasinkových plasmidech pGKL. Reportérové geny byly pod kontrolou dvou promotorů pocházejících z pGKL plasmidů iniciujících vznik transkriptů s různou strukturou. Po měření síly promotorů se ukázalo, že jejich síla je v porovnání s promotory TEF1 a PGK1 velmi nízká, až zanedbatelná.

Klíčová slova: iniciace translace, regulace genové exprese, reportérový systém, luciferáza, kvasinky, lineární plasmidy

ABSTRACT

There is currently very few information about the translation of linear cytoplasmatic plasmids occurred in yeast cells *Kluyveromyces lactis*. However, there is a relatively well developed information about their transcription apparatus. A study of transcript linear plasmids revealed an atypical organization at the 5' end. Those ends contain nontemplate polyadenylation and they are missing the N⁷ methylguanosine hat. Because of the presence of this structure, which is localized at 5' end of plasmids specific mRNA, raised a question regarding the initiation of the translation.

The present thesis is focused on the preparation of reporter system suitable for studying the influence of a number of the nontemplate adenosins, which were added at the 5' ends of mRNA linear plasmids. The first step was making a construction of dual yeast cell plasmids carrying two reporters genes, which are under the control of two different promoters. After a successful construction, the activity of promoters TEF1 and PGK1 was measured, whereby the promoter TEF1 proved twice stronger. The transcription start site of both promoter was determined. The second step was the construction of a reporter system directly in yeast cell plasmid pGKL. Reporter genes were under the control of two promoters originating from the pGKL plasmids. Those plasmids are the initiators of the creation of transcript with a different structure. After a measuring of promoters strength, it was showed that their strength in comparison with the promoters TEF1 and PGK1 is very low.

Key words: translation initiation, regulation of gene expression, reporter system, luciferase, yeast, linear plasmids

OBSAH

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A TERMÍNŮ	i
1 ÚVOD	1
2 LITERÁRNÍ PŘEHLED	3
2.1 Kvasinkové lineární cytoplasmatické plasmidy	3
2.1.1 Replikace pGKL plasmidů	7
2.1.2 Transkripce pGKL plasmidů	7
2.1.2.2 5' konce mRNA pGKL plasmidů jsou podobné mRNA viru Vaccinie	9
2.1.2.3 DNA dependentní RNA polymeráza kódovaná plasmidem pGKL2 ..	13
2.1.2.4 Enzym syntetizující N ⁷ methylguanozinovou čepičku	14
2.1.2.5 DExD/H box helikáza pGKL2	16
2.1.3 Translace	18
2.1.3.1 Faktory ovlivňující iniciaci translace u viru Vaccinie a <i>S. cerevisiae</i> .	19
2.1.3.2 Faktory ovlivňující iniciaci translace u pGKL plasmidů	21
3 CÍLE PRÁCE	23
4 MATERIÁL A METODY	24
4.1 materiál	24
4.1.1 Použité chemikálie	24
4.1.2 Roztoky a pufry	25
4.1.3 Živná média	27
4.1.3.1 Tekutá média	27
4.1.3.2 Pevné půdy	28
4.1.4 Enzymy	29
4.1.5 Komerční soupravy	29
4.1.6 Plasmidy	29
4.1.7 Primery a oligonukleotidy	30
4.1.8 Hmotnostní markery	31
4.1.9 Bakteriální a kvasinkové kmeny	31
4.2 metody	33
4.2.1 Manipulace s DNA	33
4.2.1.1 Izolace DNA	33
4.2.1.2 Stanovení koncentrace DNA a RNA	37
4.2.1.3 Agarózová elektroforéza DNA	37
4.2.1.4 Restrikční štěpení DNA	38
4.2.1.5 Defosforylace štěpených vektorů	39
4.2.1.6 Ligační reakce	39
4.2.1.7 Klonování DNA za využití soupravy TOPO [®] TA Cloning [®] Kit	39

4.2.1.8 Syntéza homopolymerního 3' konce komplementární DNA (cDNA)	40
4.2.1.9 Polymerázová řetězová reakce (PCR)	40
4.2.1.10 Transformace DNA do mikroorganismů	41
4.2.1.11 Sekvence	43
4.2.2 Manipulace s RNA	43
4.2.2.1 Izolace celkové RNA z kvasinek za použití TRI Reagent® Solution	43
4.2.2.2 Denaturační elektroforéza RNA	44
4.2.2.3 Degradace DNA za použití TURBO DNA-free kit od Ambionu	44
4.2.2.4 Syntéza homopolymerního 3' konce RNA	45
4.2.2.5 Reverzní transkripce	45
4.2.3 Manipulace s proteiny	46
4.2.3.1 Příprava kvasinkových lyzátů	46
4.2.3.2 Měření koncentrace proteinů	47
4.2.3.3 Měření aktivity luciferáz	47
4.2.4 Manipulace s mikroorganismy	47
4.2.4.1 Kultivace bakterií	47
4.2.4.2 Kultivace kvasinek	47
4.2.4.3 Uchovávání bakteriálních a kvasinkových kmenů	48
4.2.4.4 Stanovení růstu mikroorganismů	48
4.2.4.5 Příprava elektrokompetentních buněk <i>E. coli</i>	48
4.2.4.6 Stanovení auxotrofních vlastností kvasinkových kmenů	48
4.2.4.7 Pasážování kvasinkových buněk	49
5 VÝSLEDKY	50
5.1 Konstrukce bicistronního kvasinkového plasmidu	51
5.1.1 Příprava rekombinantního duálního plasmidu pCEV-G1-G418-RLuc	52
5.1.2 Příprava rekombinantního plasmidu pCEV-G1-G418-RLuc-FLuc	59
5.1.3 Příprava rekombinantního plasmidu pCEV-G1-G418-FLuc	65
5.1.4 Příprava rekombinantního plasmidu pCEV-G1-G418	68
5.2 Konstrukce reportérů přímo v lineárních plasmidech	71
5.2.1 Gen pro <i>Renilla</i> luciferázu pod kontrolou promotoru <i>K1ORF2</i>	71
5.2.2 Gen pro <i>Renilla</i> luciferázu pod kontrolou promotoru <i>K2ORF8</i>	82
5.3 Měření aktivity reportérových genů	89
5.3.1 Aktivita <i>Renilla</i> a <i>firefly</i> z pCEV-G1-G418-RLuc-FLuc	89
5.3.2 Aktivita <i>Renilla</i> luciferázy z pGKL1 plasmidu	93
6 DISKUZE	97
7 SOUHRN	101
8 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	102

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A TERMÍNŮ

bp(s)	base pairs	páry bází
BSA	bovine serum albumin	hovězí sérový albumin
cDNA	complementary DNA	komplementární DNA
dNTP	2'-deoxynucleoside-5'-triphosphate	2'-deoxynukleosid-5'-trifosfát
dsDNA	double stranded DNA	dvouvláknová DNA
dsRNA	double stranded RNA	dvouvláknová RNA
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
E-PAP	poly(A) polymerase z <i>E. coli</i>	poly(A) polymeráza z <i>E. coli</i>
eIF3	eukaryotic translation initiation factor 3	eukaryotický translační iniciační faktor 3
eIF4A	eukaryotic translation initiation factor 4A	eukaryotický translační iniciační faktor 4A
eIF4E	eukaryotic translation initiation factor 4E	eukaryotický translační iniciační faktor 4E
eIF4F	eukaryotic translation initiation factor 4F	eukaryotický translační iniciační faktor 4F
eIF4G	eukaryotic translation initiation factor 4G	eukaryotický translační iniciační faktor 4G
HygB	hygromycine B	hygromycin B
IFO	Institute for Fermentation, Osaka	Institut pro fermentaci, Osaka
INR	iniciator region	iniciátorový region
IRES	internal ribosom entry site	vstupní místo ribosomu
<i>K. lactis</i>	<i>Kluyveromyces lactis</i>	<i>Kluyveromyces lactis</i>
kDa	kilodalton	kilodalton
Lsm1	U6 snRNA-associated Sm-like protein	U6 snRNA asociovaný protein podobný Sm
mRNA	messenger RNA	mediátorová RNA
ORF	open reading frame	otevřený čtecí rámec
PABP1	poly(A) binding protein 1	poly(A) vazebný protein 1
PCR	polymerase chain reaction	polymerázová řetězová reakce
PV2A	poliovirus 2A protease	proteáza 2A z polioviru
RACE	rapid amplification of cDNA ends	rychlá amplifikace cDNA konců
RNAP	RNA polymerase	RNA polymeráza
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SAM	S-adenosyl-L-methionine	S-adenosyl-L-methionin
SSB	single stranded binding	vázající jedno vlákno
TdT	terminal deoxynucleotidyl transferase	terminální deoxynukleotidyl transferáza
TIR	terminal inverted repeats	invertované terminální repetice
tRNA	transfer RNA	transferová RNA
TSS	transcription start site	transkripční start
UCE	upstream control element	kontrolní element proti směru transkripce
UCS	upstream conserved sequence	konzervovaná sekvence proti směru transkripce
VLEs	virus-like element	viru podobný element

1 ÚVOD

O cytoplasmatických lineárních plasmidech kvasinky *K. lactis* neboli pGKL plasmidech existuje poměrně malé množství informací. Největší pozornost byla věnována studiu tzv. *killer* toxinu, který tyto plasmidy kódují. pGKL plasmidy jsou dva lineární elementy DNA vyskytující se v cytoplasmě kvasinkových buněk. Genomová struktura těchto lineárních elementů, od terminálních invertovaných repetit na obou koncích plasmidů po celkem patnáct otevřených čtecích rámců, již byla objasněna. Bez povšimnutí nezůstaly ani terminální proteiny, hrající pravděpodobně roli v replikaci těchto plasmidů, kovalentně připojené k jejich 5' koncům. Rovněž proběhla celá řada pokusů objasnit funkci proteinů, jež jsou kódovány otevřenými čtecími rámci pGKL plasmidů. Do dnešního dne se úspěšně podařilo identifikovat funkci celkem jedenácti z nich, avšak funkce posledních čtyř proteinů je dosud neznámá. Poměrně překvapivým zjištěním například bylo, že si plasmidy s nejvyšší pravděpodobností kódují sobě vlastní replikační i transkripční aparát. Se studiem transkriptomu pGKL plasmidů bylo zjištěno velmi netypické uspořádání jejich mRNA a to 5' i 3' konců. Transkripty většiny otevřených čtecích rámců pGKL na svém 5' konci nenesou N⁷ methylguanosinovou čepičku, a navíc obsahují netemplátově přidané poly(A) sekvence, což se nedá říct o jejich 3' koncích, jež naopak polyadenylaci postrádají. Tato vysoce zajímavá zjištění následně vyvolala otázku mechanismu transkripce, iniciace translace a také stability transkriptů kódovaných lineárními plasmidy.

Postupem času a s výrazným přispěním Laboratoře biochemie RNA Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy, která se výzkumem pGKL plasmidů dlouhodobě zabývá, se podařilo z velké části objasnit mechanismus transkripce genů lineárních plasmidů, jakožto i vznik a částečně důvod netypického usprádaní plasmid specifických transkriptů. Celá řada molekulárních mechanismů translace je však dosud neznámá. Tato práce je tedy zaměřena na sběr dosud dostupných informací nejen o transkripci a translaci lineárních plasmidů, ale rovněž o transkripci a translaci jim velmi podobným genetickým elementům, konkrétně dsDNA viru *Vaccinie* z čeledi *Poxviridae*. V tomto případě je v literatuře mnohem více dostupných informací právě o translaci jejich transkriptů. Tyto informace by mohly přispět k budoucímu výzkumu iniciace translace transkriptů lineárních plasmidů. Praktická část práce se zbývala návrhem a konstrukcí systému, pomocí něhož by bylo možné studium iniciace translace transkriptů pGKL plasmidů, konkrétně vlivu netemplátově přidaných adenosinových zbytků na jejich 5'

konce. Důvod a funkce této netemplátové 5' polyadenylace je totiž dosud neznámý, a ne zcela jasný.

2 LITERÁRNÍ PŘEHLED

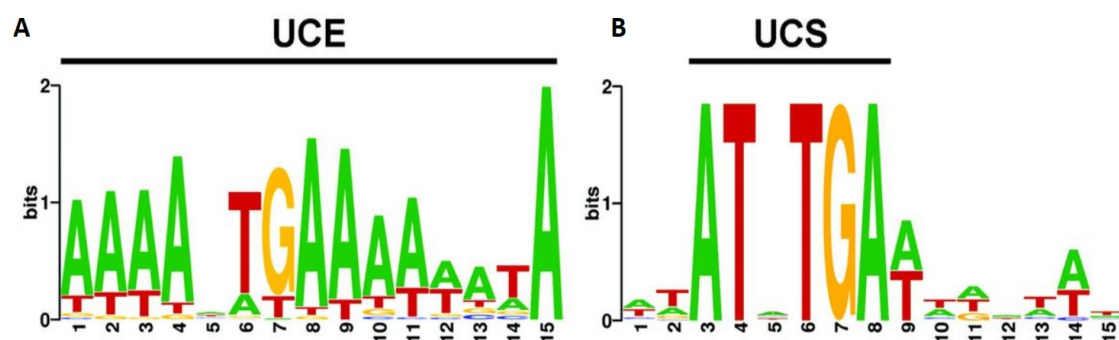
2.1 KVASINKOVÉ LINEÁRNÍ CYTOPLASMATICKÉ PLASMIDY

Kvasinky mimo mitochondriální DNA mohou obsahovat další mimojaderné genetické elementy. Jedná se o virové částice dsRNA z rodiny *Totiviridae* a viru podobné částice dsDNA označované jako cytoplasmatické plasmidy. Oba typy těchto elementů se nacházejí v cytoplasmě buněk a uchovávají *killer* fenotyp kvasinek, čímž jim udávají selekční výhodu bez výrazného zatížení hostitelské buňky (Jeske *et al*, 2007). První cytoplasmatické dsDNA elementy byly objeveny u kvasinky *Kluyveromyces lactis* (*K. lactis*), konkrétně v kmeni IFO1267 (Gunge *et al*, 1981). Podobné částice byly následně nalezeny u devíti jiných kvasinkových druhů včetně *Saccharomyces*, *Pichia*, *Wingea* a dalších. V cytoplasmě kvasinek mohou dsDNA plasmidy vytvářet propojený systém jednoho až tří elementů o různé velikosti (Jeske *et al*, 2007). Lineární plasmidy kvasinek vzájemně vykazují vysokou strukturální a funkční analogii (Kempken *et al*, 1992), což usnadňuje jejich studium prostřednictvím nejlépe popsáných a prozkoumaných plasmidů pGKL1 (označován jako K1) a pGKL2 (označován jako K2) vyskytujících se u *K. lactis*.

Výskyt pGKL plasmidů je mapován v cytoplasmě, v cca 50–100 kopiích na buňku od každého (Gunge *et al*, 1982, Stam *et al*, 1986). Genomová struktura plasmidů je velmi kompaktní a bohatá na A+T báze jak v kódujících, tak v nekódujících oblastech, které se ovšem v plasmidech téměř nevyskytují (Sor a Fukuhura, 1985). Na obou koncích se nachází invertované terminální repetice (*Terminal Inverted Repeat*, TIR) o délce 202 bp u pGKL1 a 182 bp u pGKL2 (Sor *et al*, 1983, Hishinuma *et al*, 1984). Nukleotidové sekvence TIR obou plasmidů mezi sebou nevykazují žádnou míru homologie (Sor *et al*, 1983). U plasmidů je rovněž možné nalézt terminální proteiny kovalentně připojené k jejich 5'konci (Kikuchi *et al*, 1984, Stam *et al*, 1986).

Vznik cytoplasmatických kvasinkových plasmidů není zcela objasněn. Má se za to, že mohou pocházet z cytoplasmatických virů napadajících kvasinkové buňky. Plasmid pGKL1 nekóduje svoji vlastní RNA polymerázu ani další části transkripčního aparátu, tudíž je podřízený většímu plasmidu pGKL2. Tento stav připomíná mechanismus přenosu defektivního viru, který je závislý na viru pomocném. Na základě srovnání konzervovaných sekvencí genů kódujících DNA polymerázy obou plasmidů s adenoviry je možné předpokládat jejich virový původ (Kempken *et al*, 1992, Satwika *et al*, 2012). Podobnost

pozorovaná mezi lineárními plasmidy a viry s lineárním genomem vedla k pojmenování pGKL plasmidů jako *Virus-Like Elements* (VLEs) (Jeske *et al*, 2007, Satwika *et al*, 2012). Následné analýzy ukázaly na vysokou podobnost konzervované sekvence lokalizované proti směru transkripce *Upstream Conserved Sequence* (UCS) lineárních plasmidů s obdobnou sekvencí UCE brzkých genů viru *Vaccinie* z čeledi *Poxviridae* (**Obr. 1**). Až tato podobnost plně potvrdila předpokládaný virový původ lineárních plasmidů (Sýkora *et al*, 2018).



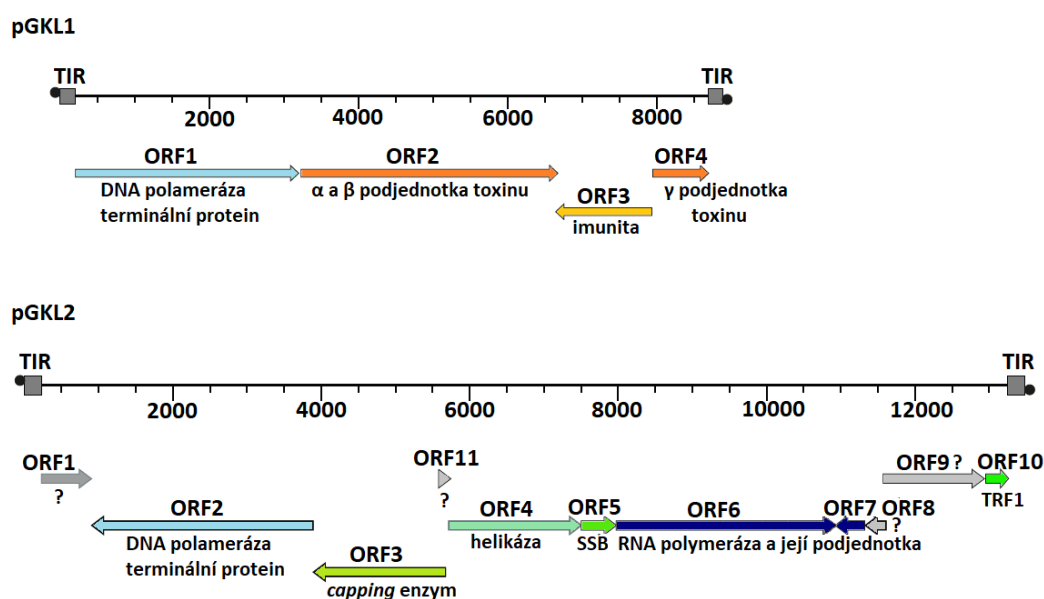
Obr. 1: Struktura promotorových oblastí brzkých genů viru *Vaccinie* a genů pGKL plasmidů. (A) Konzervovaná sekvence UCE elementu brzkých genů viru *Vaccinie*. Konsensus sekvence UCE je dlouhá 15 nukleotidů. Sekvence je rovněž bohatá na A+T páry bází (Yang *et al*, 2011). (B) Konsensus sekvence promotorových oblastí genů pGKL plasmidů získaná porovnáním 15 otevřených čtecích rámců lineárních plasmidů. Srovnání UCE elementu s elementem UCS potvrdilo virový původ pGKL plasmidů (převzato a upraveno dle Sýkora *et al*, 2018).

Délka plasmidu pGKL1 je 8 874 bp a obsahuje celkem čtyři otevřené čtecí rámce (ORF) (**Obr. 2**). *K1ORF1* kódující pGKL1 specifickou DNA polymerázu a terminální protein je těsně následován *K1ORF2*, který kóduje α a β podjednotky toxinu, přičemž zbývající γ podjednotka toxinu je kódována *K2ORF4*. Mezi *K1ORF2* a *K1ORF4* je v opačné orientaci lokalizovaný *K2ORF3* kódující imunitu proti toxinu, přičemž dochází k jeho překryvu s *K2ORF2* a 4 (Stark *et al*, 1984, Sor a Fukuhura, 1985). Plasmid pGKL1 je neautonomní, v buňkách je udržitelný pouze za přítomnosti plasmidu pGKL2 (Stark *et al*, 1990).

Plasmid pGKL2 je 13 457 bp dlouhý a zahrnuje 11 otevřených čtecích rámců, které se překrývají buď na stejném, nebo na opačném vlákně (**Obr. 2**). Funkce 7 otevřených čtecích rámců je již známá, avšak funkci *K2ORF1*, 8, 9 a 11 se prozatím nepodařilo objasnit. Jejich geny jsou však nezávisle exprimovány (Stark *et al*, 1990, Vopálenský *et al*,

2019). *K2ORF2* kóduje specifickou DNA polymerázu s terminálním proteinem (Tommasino *et al*, 1988), *K2ORF3* kóduje předpokládaný *capping* enzym (Vopálenský *et al*, 2019) a *K2ORF4* kóduje předpokládaný enzym s helikázovou aktivitou (Stark *et al*, 1990). *K2ORF5* kóduje *Single Stranded Binding protein* (SSB). *K6ORF6* a *K2ORF7* nesou geny pro RNA polymerázu a její podjednotku (Wilson a Meacock, 1988, Schaffarth a Meacock, 2001). Posledním otevřeným čtecím rámcem s objasněnou funkcí je *K2ORF10* kódující TIR vazebný protein (Tommasino, 1991). Strukturu pGKL plasmidů ukazuje Obr.

2.



TIR = *terminal inverted repeat* / terminální invertované reptice

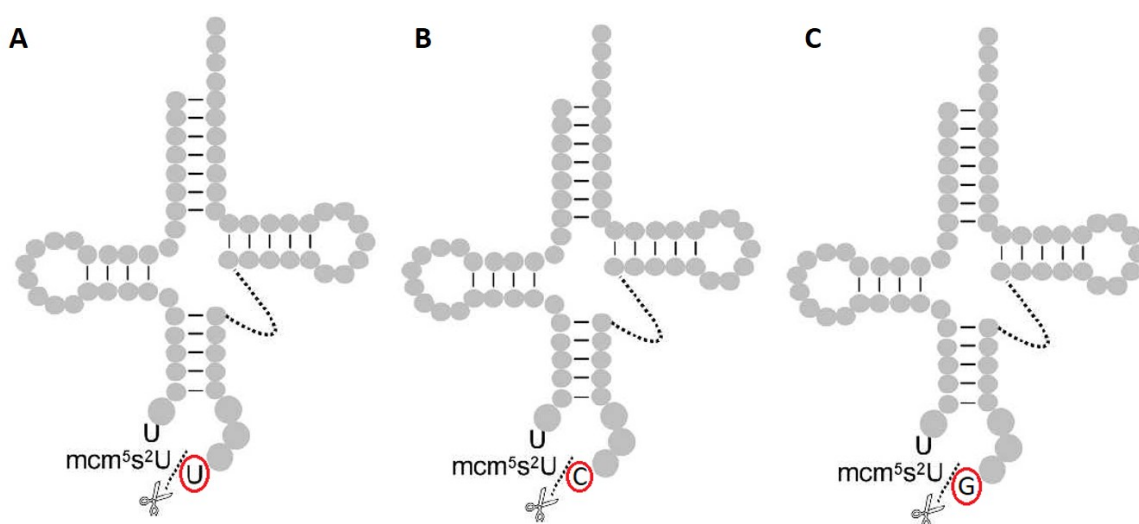
SSB = *single strand binding protein*

TRF1 = *terminal recognition factor 1*

• = terminální protein

Obr. 2: Genetická organizace lineárních cytoplasmatických plasmidů *Kluyveromyces lactis* pGKL1 a 2. Plasmid pGKL1 obsahuje celkem 4 otevřené čtecí rámce (označené šipkami ukazující směr transkripce). Plasmid si kóduje svoji vlastní DNA polymerázu a podjednotky „killer“ toxinu společně s imunitou. Plasmid pGKL2 obsahuje 11 otevřených čtecích rámců (ORF). Funkce čtyř z těchto ORF (šipky označené šedou barvou a symbolem otazníku) je neznámá. Ostatní ORF kódují proteiny důležité pro transkripci a replikaci plasmidů. Jednotlivé známé funkce otevřených čtecích rámců jsou uvedeny. Na 5' konce plasmidů jsou kovalentně připojeny terminální proteiny (černé tečky). Šedé čtverce na koncích plasmidů označují terminální invertované repetice (TIR) (Převzato a upraveno dle Vopálenský *et al*, 2019).

Plasmidy pGKL udělují kvasince *killer* fenotyp. *Killer* toxin neboli zymocin je kódován plasmidem pGKL1 a je tvořen třemi podjednotkami. Podjednotky α (99 kDa) a β (30 kDa) jsou exprimovány z *K1ORF2* za vzniku preprotoxinu. Následně v endoplasmatickém retikulu probíhá glykosylace α podjednotky a v Golgiho aparátu štěpení prekursoru proteázou Kex2 na již samostatné podjednotky α a β . Nejmenší podjednotka γ (28 kDa) je kódovaná *K1ORF4* a nese vlastní enzymatickou aktivitu. Konečná struktura toxinu je udržována pomocí disulfidických vazeb (Stark a Boyd, 1986). Mechanismus působení γ -toxinu spočívá ve štěpení 3' části modifikovaného *wobble* nukleosidu 5-methoxykarbonylmethyl-2-thiouridinu (mcm^5s^2U) antikodonové sekvence tRNA. Zymocin způsobuje u citlivých kvasinkových buněk zastavení buněčného cyklu v G1 fázi (Butler *et al*, 1991, Satwika *et al*, 2012, Lu *et al*, 2005). Mechanismus štěpení a štěpené sekvence jsou znázorněny pomocí Obr. 3.



Obr. 3: Znázornění mechanismu působení γ -toxinu na citlivé kvasinkové kmeny. γ -toxin působí na tRNA, konkrétně štěpí antikodonovou *wobble* sekvenci v pozici mezi 34. a 35. nukleotidem. (A) Štěpení antikodonu $tRNA_{mcm^5s^2UUU}$ nesoucí aminokyselinu lysin. (B) Štěpení antikodonu $tRNA_{mcm^5s^2UUC}$ nesoucí kyselinu glutamovou. (C) Štěpení antikodonu $tRNA_{mcm^5s^2UUG}$ nesoucí aminokyselinu glutamin (převzato a upraveno dle Lu *et al*, 2005).

Výsledky analýzy primární struktury pGKL plasmid specifických DNA polymeráz, kódovaných *K1ORF1* a *K2ORF2*, vykazovaly vysokou míru homologie nejen mezi samotnými plasmidy pGKL1 a 2, ale také v porovnání s některými dalšími virovými DNA

polymerázami. To také dále podporuje předpokládaný virový původ pGKL plasmidů (Tommasino *et al*, 1988).

2.1.1 Replikace pGKL plasmidů

Replikace pGKL plasmidů je nezávislá na hostitelské buňce a probíhá pomocí DNA polymeráz, jejichž sekvence je zakódovaná v samotných plasmidech pGKL (Tommasino *et al*, 1988). DNA polymerázy lineárních plasmidů spadají do B-rodiny polymeráz, které jsou charakteristické využíváním proteinových primerů při iniciaci replikace, což bylo rovněž pozorováno u bakteriofága ϕ 29 či adenovirů (Jung *et al*, 1987, Takeda *et al*, 1996, Stark *et al*, 1990). Bylo dokázáno, že jako primery slouží terminální proteiny nacházející se na 5' koncích plasmidů, které poskytují volnou -OH skupinu nutnou pro iniciaci replikace. Proteiny jsou kódovány lineárními plasmidy, a to stejnými geny jako polymerázy, konkrétně jejich N-koncovou částí (Gunge, 1986, Stark *et al*, 1990, Takeda *et al*, 1996).

Iniciace replikace probíhá pomocí vazby DNA polymerázy k transkripčnímu faktoru *Terminal Recognition Factor 1* (TRF1) (kódován *K2ORF10*) za vzniku iniciačního komplexu, který má afinitu k invertovaným terminálním repetitivním plasmidům (McNeel a Tamanoi, 1991, Tommasino, 1991). Při replikaci je jednořetězcová DNA v replikační bublině chráněna *Single Stranded Binding proteins* (SSB), které jsou kódovány *K2ORF5* (Schaffrath and Meacock 2001). Obě DNA polymerázy slouží pouze k replikaci plasmidu, kterým jsou kódovány (Kikuchi *et al*, 1985; Kitada a Gunge, 1988).

Replikace lineárních pGKL plasmidů je rovněž možná v kmenech *S. cerevisiae* postrádajících mitochondriální DNA. Replikace je ovšem stabilní pouze v haploidních kmenech obou párovacích typů kvasinek (MATa, MAT α). V diploidních buňkách dochází k expresi represoru haploidně specifických genů, který vykazuje vysokou afinitu k některým ORF pGKL plasmidů, a tím způsobuje jejich inhibici (Gunge *et al*, 1990).

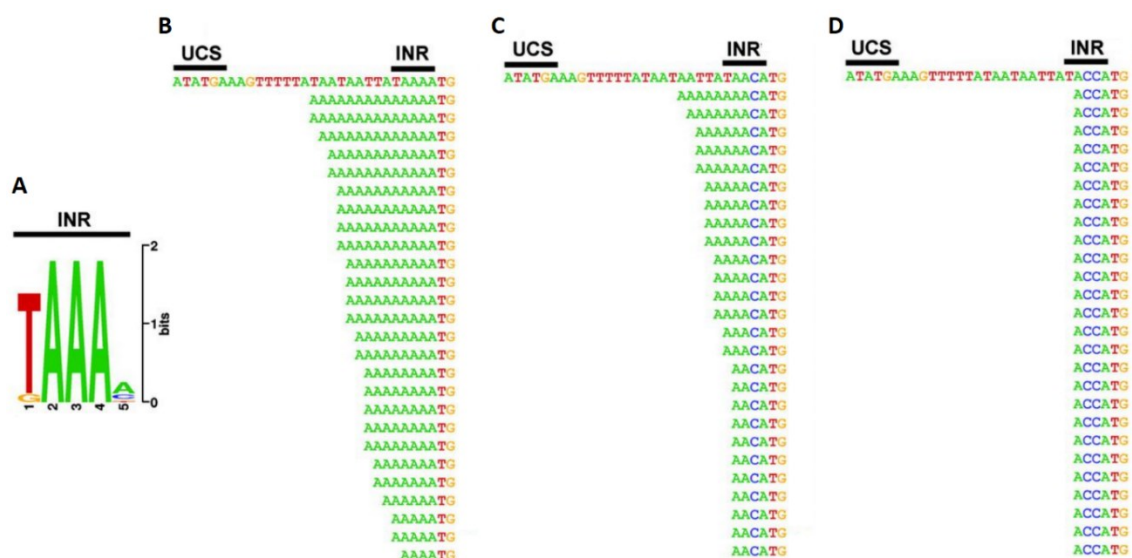
2.1.2 Transkripce pGKL plasmidů

Cytoplasmatické umístění lineárních plasmidů a aktivní transport buněčné RNA polymerázy do jádra zabraňuje pGKL plasmidům využívat transkripční aparát hostitelské buňky (Romanos a Boyd, 1988, Stark *et al*, 1990, Jeske *et al*, 2007). Bylo rovněž

prokázáno, že k transkripci pGKL specifických genů neslouží ani mitochondriální transkripční aparát hostitelské buňky, což je podpořeno skutečností, že pGKL plasmidy jsou exprimovány v kmenech *S. cerevisiae* ρ^o nebo ρ^- , tedy v kmenech postrádajících mitochondriální DNA nebo s částečně odstraněnou mitochondriální DNA (Gunge a Yamane, 1984). Lineární plasmidy tento problém obcházejí pomocí vlastního transkripčního aparátu, který si sami kódují.

Důležitou *in cis* součástí transkripčního aparátu lineárních plasmidů je sekvence UCS lokalizovaná proti směru transkripce, v průměru 20-40 nukleotidů u pGKL1 a 30-110 nukleotidů u pGKL2 před start kodónem (Schründer a Meinhardt, 1994, Schründer *et al*, 1996, Vopálenský *et al*, 2019). Jedná se vysoce konzervovanou sekvenci (5'-ATNTGA-3') vyskytující se nejen u pGKL plasmidů, ale také u jiných kvasinkových lineárních plasmidů, jejíž přítomnost je pro genovou expresi nezbytná (Stark *et al*, 1990). Byla také prokázána vzájemná zaměnitelnost UCS elementů mezi rozdílnými plasmidovými lineárními elementy, neboť byl připraven rekombinantní lineární plasmid pGKL1, nesoucí reportérový gen pod kontrolou UCS elementu pocházejícího z *K2ORF6* plasmidu pBE1P (lineární cytoplasmatický plasmid nacházející se u kvasinky *Pichia etchellsii*) (Klassen *et al*, 2001). Síla promotoru není u všech otevřených čtecích rámců pGKL plasmidů stejná. Nejvíce exprimovaným otevřeným čtecím rámcem je gen pro RNA polymerázu (*K2ORF6*), poté, co do hladiny exprese, následuje gen pro DNA polymerázu pGKL1 (*K1ORF1*) a helikázu pGKL2 (*K2ORF4*). Naproti tomu nejnižší míru genové exprese vykazoval *K2ORF2* pGKL2 kódující DNA polymerázu. To ukazuje na různou aktivitu UCS elementů v závislosti na požadavcích lineárních plasmidů (Schründer a Meinhardt, 1995, Schickel *et al*, 1996). Promotorová oblast otevřených čtecích rámců pGKL plasmidů byla nedávno rozšířena o další konzervovanou sekvenci nazvanou jako iniciátorový region (*IN*itiator *R*egion, INR). Tato sekvence byla detekována na základě její podobnosti s iniciátorovým regionem středních a pozdních genů viru *Vaccinie* (Sýkora *et al*, 2018). Transkripce pGKL plasmidů je monocistronní (Jeske *et al*, 2007). Vzhledem ke geneticky velmi kompaktnímu uspořádání pGKL plasmidů s překrývajícími se otevřenými čtecími rámci zůstávala otázka terminace transkripce do nedávna nevyřešena. Avšak na základě detekce 3' konců pGKL transkriptů metodou 3'RACE-PCR došlo k jejímu objasnění. Terminace transkripce probíhá pomocí slabých vlásenek pravděpodobně v kombinaci s oligo(U) nabohacenou sekvencí na 3' konci mRNA transkriptů (**Obr. 4**). Tyto vlásenkové struktury transkriptů jsou tedy nezbytné nejen pro samotnou formaci 3' konců mRNA, ale zároveň působí jako nezávislé vnitřní terminátory transkripce, přičemž je jejich funkce nezávislá na

nízkým počtem netemplátových adenosinů a geny s větším počtem netemplátových adenosinů a ve většině případech bez 5' čepičky (Vopálenský *et al*, 2019). Přítomnost poly(A) struktur na 5' koncích transkriptů pGKL plasmidů vyvolala otázku jejich vzniku. V úvahu byly vzaty promotorové oblasti otevřených čtecích rámců pGKL. Pomocí analýzy promotorových oblastí genů generujících 5' polyadenylované transkripty byla nalezena konzervovaná iniciátorová sekvence (INR). Na základě mutací situovaných do sekvence INR byla pozorována vysoká korelace právě mezi touto konsensus sekvencí a přítomností poly(A) sekvence na 5' konci mRNA. Mechanismus vzniku 5' poly(A) konce je dán vysoce pravděpodobně klouzáním RNA polymerázy po INR elementu, konkrétněji po adenosinech, které jsou jeho součástí. Bylo dokázáno, že čím více adenosinů INR element obsahuje, tím delší je 5' poly(A) sekvence transkriptu, neboť RNA polymeráza po nich může při iniciaci transkripce opakovaně klouzat. Velmi podobný mechanismus vzniku 5' poly(A) sekvence byl rovněž pozorován u transkriptů středních a pozdních genů viru *Vaccinie*. Rovněž INR element promotorů středních a pozdních genů tohoto viru je vysoce podobný pGKL plasmidům (Sýkora *et al*, 2018). Strukturu INR elementu a 5' poly(A) netemplátové konce pGKL transkriptů ukazuje **Obr. 5**.



Obr. 5: Součástí promotorů pGKL plasmidů je sekvence INR (iniciátorový region) zodpovídající za připojení netemplátových adenosinů na 5' konec transkriptů. (A) Konzervovaná sekvence INR elementu získaná srovnáním 12 promotorových oblastí genů, jejichž transkripty obsahují netemplátovou 5' poly(A) sekvenci. (B) Sekvence promotoru obsahující UCS společně s INR elementem (horní lišta) a 5' nepřekládané oblasti s netemplátovou poly(A) sekvencí. (C) Mutovaný INR element obsahující jednonukleotidovou substituci v INR a 5' nepřekládané oblasti transkriptů genu kontrolovaným tímto promotorem. (D) Mutovaný INR element s dinukleotidovou substitucí v INR a 5' nepřekládané oblasti transkriptů genů pod kontrolou tohoto promotoru. Pro (B), (C) a (D) platí, že transkripty byly získány za pomoci vytvoření nových kvasinkových kmenů s upraveným plasmidem pGKL1. Pod kontrolu promotoru K1ORF2 byl vložen gen pro rezistenci ke G418. INR element byl následně ve dvou případech mutován, kdežto v jednom zůstala původní sekvence. Následně byly mapovány 5' konce transkriptů genů kontrolovaných těmito promotory. Struktura INR elementu má zásadní vliv na polyadenylaci 5' konce mRNA (převzato a upraveno dle Sýkora et al, 2018).

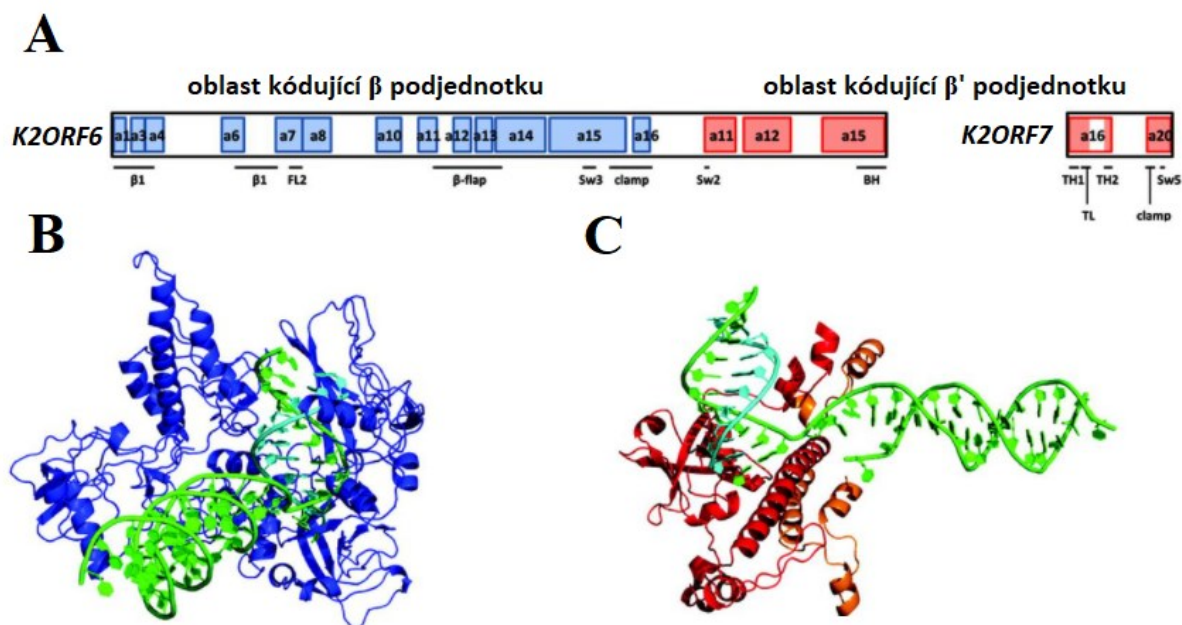
Jak již bylo naznačeno, 5' konce transkriptů většiny genů kódovaných pGKL plasmidy vykazují pozoruhodnou podobnost s transkripty postreplikativních genů viru *Vaccinie* (Sýkora et al, 2018). U viru *Vaccinie* jsou rozlišovány tři třídy genů, a sice časné, střední a pozdní. Jejich exprese je řízena časově, kdy nejdříve dochází k expresi genů časných kódujících mimo jiné proteiny replikačního aparátu a transkripčního aparátu středních genů. Střední geny dále kódují transkripční aparát pozdních genů. U transkriptů

pozdních genů byla pozorována překvapivá sekvence cca 35 netemplátově přidaných adenosinů na jejich 5' konci (Schwer *et al*, 1987, Bertholet *et al*, 1987, Schwer a Stunnenberg, 1988). Již dříve byla detekována konzervovaná sekvence 5'-TAAAT-3' vyskytující se u promotorů pozdních genů *Vaccinie* (Plucienniczak *et al*, 1985, Hanggi *et al*, 1986). Na základě mutací v této sekvenci bylo zjištěno, že její přítomnost je nutná pro jejich pozdních genů. Zároveň mutace v okolí této konzervované sekvence nemají na genovou expresi buď žádný, nebo jen velmi malý vliv. Je vcelku překvapivé, že se tato konzervovaná sekvence vyskytuje v těsném sousedství AUG start kodónu, přičemž je start kodón občas i její součástí (Schwer *et al*, 1987). Tato specifická 5' netemplátová poly(A) oblast mRNA byla rovněž pozorována u dalších virů řadících se k poxvirům. Patel se spolupracovníky (Patel, *et al*, 1986, Patel a Pickup, 1987) takto identifikoval jeden z nejvíce exprimovaných genů viru kravských neštovic (*CoxPox Virus*, CPV). Jednalo se o gen kódující hlavní proteinovou složku inkluzních tělísek typu A. Důležité je, že se řadí k pozdním genům tohoto viru. Na základě analýzy transkriptů tohoto genu bylo nalezeno 5-21 netemplátových adenosinů na jejich 5' konci. Další podobností s pozdními geny viru *Vaccinie* je přítomnost promotorové konsensus sekvence 5'-TAAATG-3', jejíž součástí je rovněž start kodón AUG. Jak bylo zjištěno dříve (Wei a Moss, 1975, Boone a Moss, 1977) transkripty genů všech časových tříd viru *Vaccinie* obsahují na svém 5' konci čepičku typu 1 (*cap 1*). Ahn a Moss (Ahn a Moss, 1989) dále detekovali přítomnost minimálně dvou netemplátových adenosinových zbytků na 5' konci mRNA obsahujících čepičku transkriptů pozdních genů *Vaccinie*. Délka této netemplátové poly(A) sekvence byla poměrně variabilní. Další zajímavostí je přítomnost 5' poly(A) sekvence u časného transkriptu genu viru *Vaccinie* kódujícího podjednotku RNA polymerázy (18 kDa) *D7R*. U tohoto genu byla pozorována přítomnost již zmíněné INR konsensus sekvence promotoru pozdních genů rovněž v promotoru tohoto časného genu, ačkoliv toto uspořádání je typické pro pozdní geny (Ahn *et al*, 1990). Následná analýza transkriptů genu 18 kDa podjednotky RNA polymerázy potvrdila přítomnost cca 11 netemplátových adenosinů na 5' konci transkriptů. To, že je sekvence 5'-TAAAT-3' zodpovědná za polyadenylaci 5' konců transkriptů bylo potvrzeno pomocí experimentu, kdy byl časný promotor genu 38K *Vaccinie* mutován tak, aby obsahoval tuto konzervovanou sekvenci v odpovídající vzdálenosti od start kodónu místo sekvence původní. Poté transkripty tohoto časného genu obsahovaly na svém 5' konci netemplátové poly(A) sekvence. Dalším překvapivým zjištěním změna časové třídy exprese takto upraveného genu, neboť tento gen, ač původně gen časné časové třídy, byl exprimován v pozdní fázi infekce (Ink a Pickup, 1990). Jak již

bylo naznačeno, u pGKL plasmidů a viru *Vaccinie* se nachází specifická INR sekvence zodpovědná za vznik netemplátové 5' poly(A) sekvence jejich transkriptů, což spojuje tyto dvě jinak nesourodé skupiny genetických elementů.

2.1.2.3 DNA dependentní RNA polymeráza kódovaná plasmidem pGKL2

Unikátní genomová charakteristika lineárních cytoplasmatických plasmidů kvasinek naznačuje specifičnost genové exprese jejich genů. Plasmid pGKL1 je neautonomní, což naznačuje, že nositelem genů pro specifický transkripční aparát je větší autonomní plasmid pGKL2 (Stark *et al*, 1990). Hlavní komponentou transkripčního aparátu lineárních plasmidů je specifická nekanonická RNA polymeráza (RNAP) kódována *K2ORF6* a její podjednotka (*K2ORF7*) (Wilson a Meacock, 1988). *K2ORF6* byl rovněž charakterizován jako gen nezbytný pro udržení pGKL plasmidů v buňce (Schaffrath *et al*, 1995), stejně tak RNAP lineárních plasmidů je sekvenčně odlišná od archeálních, bakteriálních i eukaryotních polymeráz. Byla však pozorována podobnost úseku 80 aminokyselin mezi *K2ORF6p* a RNA polymerázou *E. coli*. Následně byly objeveny další dvě sekvence vykazující homologii k velkým podjednotkám β a β' RNA polymerázy *E. coli* (Wilson a Meacock 1988). Později se podařilo charakterizovat celkem 16 shodných oblastí z celkem 36 konzervovaných sekvencí nacházejících se u bakteriálních, eukaryotických a archeálních RNA polymeráz (Lane a Darst 2010, Ruprich-Robert a Thuriaux, 2010, Sýkora *et al*, 2018). Protein *K2ORF6p* má znaky sloučení β a β' podjednotky, kdy část β' podjednotky chybí (Ruprich-Robert a Thuriaux 2010, Sýkora 2013). Homologie odpovídající dvou oblastem β' podjednotky byla nalezena u *K2ORF7p* (Schaffrath *et al*, 1997). Jelikož funkce β a β' podjednotky RNA polymerázy *E. coli* spočívá ve vazbě DNA a nukleotidů, lze předpokládat, že sloučením podjednotek β a β' do jediného polypeptidu *K2ORF6p* zastává obě funkce pouze tento protein (Stark *et al*, 1990). Gen *K2ORF7* byl rovněž charakterizován jako nepostradatelný pro udržení plasmidů v buňce (Schaffrath *et al*, 1997).



Obr. 6: (A) Kódující oblasti genů K2ORF6 a K2ORF7 kódující RNA polymerázu pGKL plasmidů a její podjednotku. Modře jsou znázorněny konzervované oblasti β podjednotky K2ORF6p. Červeně jsou znázorněny konzervované oblasti β' podjednotky K2ORF6p a K2ORF7p. (B) 3D struktura aminokyselinových zbytků 1-693 K2ORF6p, představujících homolog β podjednotky (modrá), dále je zde zobrazena DNA (zelená) a mRNA (tyrkysová). (C) 3D struktura zbytků 754-882 a 894-974 K2ORF6p neboli homologu β' podjednotky (červená) a zbytků K2ORF6p 1-52 a zbytků K2ORF7p 103-132 představujících homolog β' podjednotky (oranžová), DNA (zelená), RNA (tyrkysová) (převzato a upraveno dle Sýkora *et al*, 2018).

2.1.2.4 Enzym syntetizující N^7 methylguanozinovou čepičku

Po objevení plasmidů pGKL bylo otázkou, zda jsou jimi kódované geny nezbytné pro jejich existenci v buňce. Podobnému zkoumání byl podroben také otevřený čtecí rámec 3 pGKL2. Byl proveden genový *knock out*, kdy bylo cca 200 nukleotidů K2ORF3 substituováno za jiný genetický materiál nesoucí selekční marker. Kultivace transformantů po 400 generací v selekčním médiu nevedla ke ztrátě nativního pGKL2 plasmidu, což dokazuje nepostradatelnost K2ORF3 (Larsen *et al*, 1998). Plasmidy pGKL jsou nezávislé na buněčném transkripčním a replikačním aparátu (Meinhardt *et al*, 1997), bylo tedy předpokládáno, že si kódují i další enzymy důležité pro vlastní transkripci. Porovnání

sekvencí genů kódujících virové *capping* enzymy se sekvencí *K2ORF3* prokázalo jejich vysokou podobnost (Larsen *et al*, 1998).

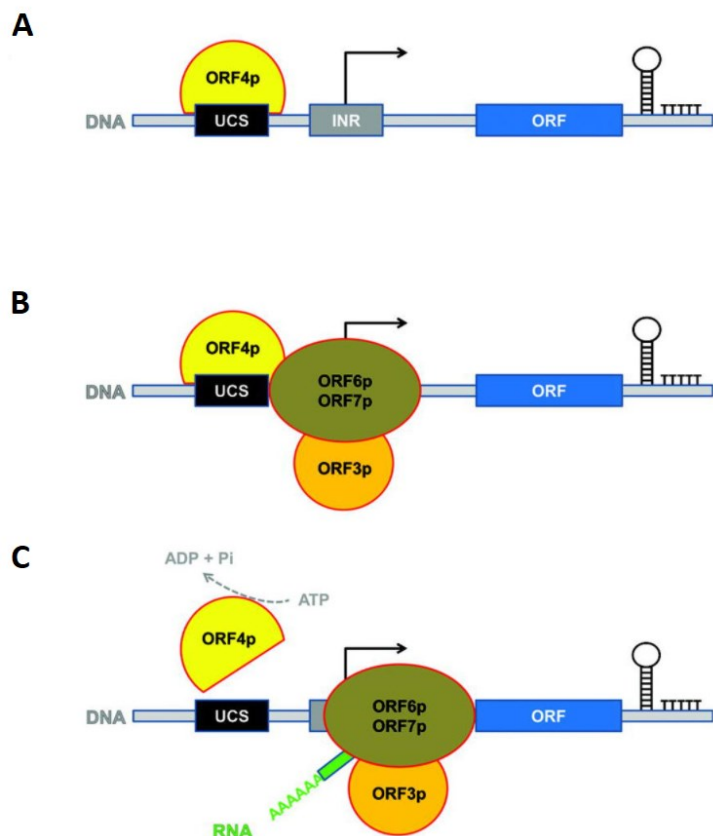
Pro úspěšnou iniciaci eukaryotní translace a translace některých eukaryotních virů je nutná přítomnost N⁷ methylguanosinové čepičky na 5' konci transkriptů. Pro syntézu čepičky (označované jako *cap* 0) jsou zapotřebí tři enzymatické aktivity, a sice RNA-trifosfátázová, guanylyltransferázová a methyltransferázová aktivita (pro přehled viz Ghosh a Lima, 2010). U *K2ORF3p* byly prokázány dvě ze tří enzymatických aktivit důležitých pro syntézu *cap* struktury mRNA. Jedná se o aktivity trifosfátázovou a guanylyltransferázovou. Obě enzymatické aktivity jsou součástí jednoho polypeptidu, což naznačuje možnou přítomnost rovněž poslední enzymatické methyltransferázové aktivity, která však zatím nebyla prokázána (Larsen *et al*, 1998, Tiggeman *et al*, 2001, Vopálenský 2007). Jak již bylo řečeno, jeden polypeptid *K2ORF3p* nese pravděpodobně všechny tři enzymatické aktivity. Jejich rozmístění bylo dokázáno pomocí srovnání konzervovaných sekvencí dalších *capping* enzymů, mezi něž patřil i *capping* enzym viru *Vaccinie* (Shuman 1995, Larsen *et al*, 1998). Na N-konci proteinu je umístěna trifosfátázová aktivita a centrální část uchovává aktivitu guanylyltransferázovou (Shuman a Schwer, 1995, Larsen *et al*, 1998, Hausmann *et al*, 2002). Na C-konci je pravděpodobná methyltransferázová aktivita, což ukazuje sekvenční motiv typický pro vazbu S-adenosyl-L-methioninu (SAM) (Larsen *et al*, 1998).

Proteinový produkt *K2ORF3p* vykazuje sekvenční i funkční podobnost s *capping* enzymem viru *Vaccinie* kódovaným genem *D1*. Aby byla funkční methyltransferázová aktivita *capping* enzymu *Vaccinie*, je třeba fúze proteinu *D1p* s menším proteinem *D12p*, což zvýší aktivitu *capping* enzymu až 30x. Proteinové produkty nedefinovaných otevřených čtecích rámců *pGKL2* by mohly sloužit podobným způsobem, tj. mohly by kódovat aktivátory methyltransferázové aktivity *K2ORF3p* (Jeske *et al*, 2007). Bylo ovšem dokázáno, že *K2ORF3p* je důležitou součástí transkripčního aparátu *pGKL* plasmidů a je pro jejich přítomnost v buňce esenciální. Díky nedávným analýzám bylo také rovněž ukázáno, že *K2ORF3p* je součástí transkripčního komplexu *pGKL* plasmidů (Sýkora *et al*, 2018).

2.1.2.5 DExD/H box helikáza pGKL2

Pomocí bioinformatické analýzy otevřeného čtecího rámce 4 plasmidu pGKL2 byla nalezena podobnost se dvěma sekvencemi viru *Vaccinia*. Konkrétně se jednalo o dva geny helikáz *D11L* a *D6R*. Gen *D11L* kóduje enzym s nukleosidtrifosfáthydrolázovou aktivitou (NPH1) a *D6R* kóduje podjednotku heterodimerního časného transkripčního faktoru *Vaccinie* (VETF) (Wilson a Meacock, 1988). Tyto virové helikázy spadají do super rodiny 2 a do podskupiny DExD box (Jeske *et al*, 2007). Helikázy spadající do super rodiny 2 mají schopnost štěpit ATP pomocí interakce s nukleovými kyselinami (Byrd a Raney, 2012). Sekvence ORF4 vykazuje největší homologii ke zmíněným virovým helikázám super rodiny 2, a proto je řazena do stejné kategorie (Baylis *et al*, 1993). Přesná funkce ORF4 není dosud plně objasněna, avšak je jisté, že je nezbytný pro udržení plasmidů pGKL v buňce (Schaffrath *et al*, 1995). Nedávno bylo také ukázáno, že K2ORF4p je součástí transkripčního komplexu pGKL plasmidů (Sýkora, 2018).

Předpokládanou strukturu a funkci transkripčního komplexu pGKL plasmidů, který je velmi pravděpodobně zcela soběstačný, ukazuje **Obr. 7**. Centrální část tohoto komplexu je tvořena RNA polymerázou, její podjednotkou (K2ORF6p a K2ORF7p) a *capping* enzymem (K2ORF3p). S podjednotkami RNA polymerázy je dále asociovaná helikáza K2ORF4p, avšak tato vazba není příliš silná, případně je pouze transientní (Sýkora *et al*, 2018).



Obr. 7: Znázornění procesu transkripce otevřených čtecích rámců pGKL plasmidů *K. lactis*. (A) Na promotorový úsek DNA lineárních plasmidů, konkrétně na sekvenci umístěnou proti směru transkripce Upstream Control Sequence (UCS, černá barva) se váže helikáza K2ORF4p (na obrázku vyznačená zkratkou ORF4p, žlutá barva). (B) Komplex RNA polymerázy a její podjednotky (označení ORF6p a ORF7p, zelená barva) je přitažen k DNA již přítomnou helikázou K2ORF4p na úsek DNA umožňující iniciaci transkripce, konkrétně na iniciátorový region (INR, šedá). INR element umožňuje případné klouzání RNA polymerázy po transkriptu za přidání netemplátových adenosinů na jeho 5' konec. RNAP může být asociovaná s capping enzymem K2ORF3p (na obrázku ORF3p, oranžová barva). (C) K2ORF4p, K2ORF6p/K2ORF7p a K2ORF3p tvoří preiniciační komplex. Komplex je z promotorové oblasti uvolněn pomocí hydrolýzy ATP a za současného uvolnění K2ORF4p. Vznikající transkript obsahuje poly(A) sekvenci na svém 5' konci, který může rovněž obsahovat čepičkovou strukturu, syntetizovanou K2ORF3p. Terminace transkripce je pravděpodobně nezávislá na jiných proteinových faktorech, naopak je umožněna pomocí vnitřních terminátorů v podobě RNA vlásenek (černá barva) a případnou oligo(U) nabohacenou sekvencí na 3' koncích transkriptů (převzato a upraveno dle Sýkora et al, 2018).

2.1.3 Translace

Iniciace eukaryotické translace probíhá pomocí vazby translačních iniciačních faktorů k 5' lokalizované čepičce na mRNA. Čepička je syntetizována za pomoci tří enzymatických aktivit. Nejdříve dochází k odstranění pyrofosfátu z trifosfátového 5' konce mRNA pomocí pyrofosfátázové aktivity enzymu. Následně guanylyltransferáza zajistí přenos GMP na difosfátový konec mRNA a proces je zakončen přenesením methylové skupiny z S-adenosyl-L-methioninu (SAM) na pozici N⁷ terminálního guanosinu. N⁷ methylguanozinová čepička je k 5' transkriptu připojena netypickou 5'-5' kovalentní vazbou. Mechanismus vzniku čepičky, tedy tři potřebné enzymatické aktivity jsou napříč organismy vysoce konzervativní, avšak samotný *capping* aparát se napříč organismy liší (pro přehled Ghosh a Lima 2010). 3' konce eukaryotních transkriptů bývají obvykle polyadenylovány pomocí aktivity poly(A) polymerázy (pro přehled Ustyanstev *et al*, 2017). Iniciace translace je u eukaryotních mRNA zprostředkována pomocí translačních iniciačních faktorů s označením eIF, které společně s 40S podjednotkou ribozomu vytváří preiniciační komplex 43S. Mezi iniciační faktory rovněž patří komplex tří proteinů eIF4F, který je zodpovědný za rozeznání čepičky. Po vazbě eIF4F na čepičku mRNA dochází k naverbování preiniciačního komplexu na 5' UTR mRNA, která je za spotřeby ATP skenována až do nálezů kompetentního start kodónu AUG, což umožní další krok translace (pro přehled Hinnebusch, 2014).

U transkriptů lineárních plasmidů bylo sledováno netypické uspořádání obou konců mRNA. 3' konce nevykazují předpokládanou polyadenylaci typickou pro eukaryotní mRNA. Naopak zde byly pozorovány vlásenkové struktury, které velmi pravděpodobně hrají roli v terminaci transkripce (Sýkora *et al*, 2018, Vopálenský *et al*, 2019). Na 5' koncích některých transkriptů genů pGKL plasmidů byl překvapivě detekován různý počet netemplátově přidaných adenosinových zbytků. Syntézu 5' poly(A) a konečný počet netemplátových adenosinů, rovněž jako přítomnost 5' čepičky ovlivňují plasmidové promotory, konkrétně sekvence INR elementu. Roli hraje i samotná RNA polymeráza a její podjednotka (Sýkora *et al*, 2018, Vopálenský *et al*, 2019). Mechanismus iniciace translace pGKL plasmid specifických mRNA je, minimálně u transkriptů pGKL plasmidů neobsahujících čepičku, dosud neobjasněn.

2.1.3.1 Faktory ovlivňující iniciaci translace u viru *Vaccinie* a *S. cerevisiae*

O samotné translaci lineárních cytoplasmatických plasmidů kvasinek nejsou známé žádné informace. Abychom mohli lépe diskutovat možné mechanismy iniciace translace, je třeba se podívat na jiný, pGKL plasmidům velmi podobný, systém. Konkrétně je třeba se zaměřit na virus *Vaccinie*. Možné podobnosti byly rovněž sledovány u kvasinky *S. cerevisiae*.

V otázce iniciace translace genů viru *Vaccinie* v hostitelské buňce byl mimo jiné diskutován translační iniciační faktor eIF4F. Jedná se o eukaryotní proteinový komplex sestávající ze 3 proteinů. Patří sem eIF4E zodpovědný za rozpoznání 5' *cap* struktury, dále eIF4A sloužící jako RNA helikáza a eIF4G představující jakési lešení pro ostatní proteiny. V buněčných kmenech obsahujících proteázu PV 2A docházelo sice ke štěpení eIF4G proteinu, který je součástí komplexu vázajícího čepičku eIF4F, nicméně nefunkční faktor eIF4G neměl vliv na expresi pozdních genů viru *Vaccinie*, kterým byly buňky infikovány. Iniciace translace pozdních genů *Vaccinie* je tímto na eIF4F jen málo, pokud vůbec, závislá (Mulder *et al*, 1998).

To, že je iniciace translace u transkriptů pozdních genů viru *Vaccinie* na čepičce nezávislá podporuje rovněž další výzkum provedený pomocí termosensitivních mutantů v *capping* enzymu viru *Vaccinie*. Mutovaný protein byl defektní při nepermisivní teplotě ve dvou jeho aktivitách, konkrétně v guanylyltransferázové a methyltransferázové. Jedná se o enzymatické aktivity esenciální pro syntézu čepičky. Byly sledovány expresní hladiny virových transkriptů a jejich proteinů jak při teplotě permisivní (31°, vzniká funkční *capping* enzym), tak nepermisivní teplotě (40°, vzniká nefunkční *capping* enzym). Rozdíl v produkci virových proteinů při odlišných teplotách je minimální, proto lze říct, že exprese virových proteinů je poměrně nezávislá na jeho vlastním *capping* enzymu (Hassett *et al*, 1997).

Další zajímavostí je schopnost 5' poly(A) sekvencí zvýšit účinnost translace v eukaryotních bezbuněčných systémech *in vitro* (Gudkov *et al*, 2005). Autoři článku (Gudkov *et al*, 2005) testovali různě dlouhé 5' poly(A) sekvence pro zvýšení výtěžku translace v eukaryotních bezbuněčných systémech *in vitro*. Bylo ukázáno, že transkripty s poly(A) sekvencí a bez 5' *cap* struktury vykazovaly vzrůstající míru translace v systémech *in vitro* v korelaci se vzrůstající délkou poly(A) sekvence. Byly testovány 3 délky 5' poly(A) sekvence, konkrétně 25 adenosinů (zde byla míra translace největší), 12 adenosinů a 5 adenosinů (zde byla míra translace nejmenší) (Gudkov *et al*, 2005).

Každopádně autoři vzali v úvahu vlastnosti 5' poly(A) sekvencí, které jsou vysoce specifické. Výhodou je jasná strukturovanost jednořetězcové poly(A), která ve fyziologických podmínkách vytváří jednořetězcovou šroubovici (Sanger *et al*, 1975). Navíc u mRNA s 5' poly(A) sekvencí (ale obsahující analog čepičky na 5' koci) nebyla pozorována samoinhibice translace. Jedná se to takzvaný samoinhibiční účinek, který funguje v systémech s přebytkovou mRNA a v případě ničím neomezené translace. Samoinhibice je indukovaná pomocí translačního iniciačního faktoru eIF4F, konkrétně jeho sekvestrováním, kdy se váže na tzv. „uzavřené“ molekuly mRNA. Roli hraje rovněž 3' poly(A) sekvence. Na základě pokusů s využitím 5' polyadenylovaných mRNA, obsahujících ovšem opět analog čepičky na 5' konci, byla pozorována absence samoinhibičního účinku u mRNA pozdních genů viru *Vaccinie* (Bablanian *et al*, 1991).

Bylo rovněž prokázáno, že 5' poly(A) sekvence u postreplikativních transkriptů viru *Vaccinie* poskytují viru evoluční výhodu při translaci v infikovaných buňkách. V HeLa buňkách byla testována různá délka (od 4 do 20 adenosinových zbytků) poly(A) sekvencí nacházejících se před AUG start kodónem mRNA transkriptů. mRNA obsahující 12 netemplátově přidaných adenosinových zbytků na 5' konci vykazovaly nejvyšší míru translace, která byla cca 8x vyšší, než tomu bylo u 5' poly(A) leadru o délce 4 adenosinové zbytky. Vzhledem k tomu, že nejčastější počet adenosinů u postreplikativních mRNA *Vaccinie* je mezi 8 až 12, bylo jasně dokázáno, že poly(A) sekvence efektivně zvyšuje účinnost translace. Rovněž byl také testován vliv dalších nukleotidových zbytků na translaci. Postupně byl v sekvenci dvanácti adenosinových zbytků lokalizovaných na 5' konci mRNA měněn adenosin za uracil či guanin, kdy byl vždy nahrazen vždy pouze jeden z adenosinů. Každá jednonukleotidová substituce měla negativní vliv na míru translace ve srovnání s nemutovanou sekvencí. To naznačuje, že nepřerušovaný 5' poly(A) leader je esenciální pro účinnou translaci (Dhungel *et al*, 2017). Další pokusy proběhly s analogem čepičky lokalizovaným na 5' konci před 12 adenosiny na 5' konci mRNA. Je nutno zdůraznit, že analog čepičky nemůže být vázán komplexem eIF4F, který se podílí na iniciaci translace eukaryotických mRNA. Avšak transkripty s analogem čepičky a 5' poly(A) sekvencí nevykazovaly v tomto případě žádné snížení efektivity translace, což rovněž potvrzuje předchozí výzkumy dokazující, že je translace postreplikativních genů viru *Vaccinie* na čepičce nezávislá (Dhungel *et al*, 2017). Nedávno bylo rovněž prokázáno, že translace mRNA obsahujících na 5' konci poly(A) sekvenci je nezávislá na IRES (*Internal Ribosome Entry Site*) elementu, za kterou by mohla být poly(A) sekvence považována (Dhungel *et al*, 2017). Toto zjištění rovněž podporuje hypotézu vazby 48S

ribozomální podjednotky na definovaný počet adenosinových zbytků (konkrétně 25) nacházejících se před AUG sekvencí mRNA transkriptů, což umožňuje iniciovat translaci bez vazby iniciačních faktorů eIF3 a eIF4F. Přítomnost poly(A) sekvence na 5' koncích mRNA tedy vede k alternativnímu mechanismu iniciace translace (Shirokikh a Spirin, 2008).

Dalším systémem, který stojí za zmínku z hlediska nekanonické iniciace translace, jsou vybrané transkripty *S. cerevisiae*, které na svém 5' konci obsahují nepřekládanou oblast tvořenou adenosiny (Gilbert *et al*, 2007). Bylo zjištěno, že pokud počet adenosinových zbytků nepřesáhne 11, slouží tato sekvence jako *enhancer* (zesilovač) translace *in vivo*. Jakmile počet adenosinů překročí číslo 12, míra translace rapidně klesá, což může být způsobeno např. vazbou proteinu PABP1. Tento protein vykazuje vysokou afinitu vůči poly(A) sekvencím s počtem adenosinů 12 a více, čímž může inhibovat translaci (Xia *et al*, 2011).

Tyto jednotlivé výzkumy na strukturách podobných transkriptům pGKL plasmidů umožňují sledovat směr ve výzkumu jejich nekanonické iniciace translace.

2.1.3.2 Faktory ovlivňující iniciaci translace u pGKL plasmidů

Iniciace translace postreplikačních mRNA viru *Vaccinie* je nezávislá na 5' *cap* struktuře a tím pádem na translačních iniciačních faktorech (Bablanian *et al*, 1991, Hasset *et al*, 1997, Mulder *et al*, 1998, Shirokikh a Spirin, 2008, Dhungel *et al*, 2017). Předpokládaná nezávislost transkriptů pGKL plasmidů na translačních iniciačních faktorech byla potvrzena pomocí narušení funkce proteinu eIF4E, který je zodpovědný za rozpoznání 5' čepičky na mRNA. Funkční *killer* toxin kódový plasmidem pGKL1 (viz kapitola 2.1) byl exprimován v modifikovaném kmeni *S. cerevisiae* nesoucím pGKL plasmidy a zároveň obsahujícím termosensitivní mutaci právě ve faktoru eIF4E (Altmann *et al*, 1989). I přes nefunkčnost eIF4E byl výsledný transkript překládán, což nezávislost alespoň některých pGKL transkriptů obsahujících na 5' konci poly(A) sekvenci na přítomnosti eIF4E potvrzuje (Vopálenský *et al*, 2019).

Pomocí delece genu pro protein PABP1 byla dále potvrzena možná regulace translace závislá na délce 5' poly(A) sekvence u pGKL transkriptů. V kvasince *K. lactis*, kde došlo k deleci *PAB1*, byla pozorovaná zvýšená míra produkce *killer* toxinu kódovaného plasmidem pGKL1. PABP1 může tedy sloužit jako potenciální negativní regulátor

translace vazbou na 5' poly(A) sekvenci transkriptů pGKL plasmidů, která je delší než 12 adenosinových zbytků (Vopálenský *et al*, 2019).

Dalším možným regulátorem translace byl vytipován protein Lsm1. Dle původního zjištění se komplex proteinů Lsm1-Lsm7 se společně s proteinem Pat1 váže na transkripty v eukaryotických buňkách, kde hraje roli při odstranění čepičky z 5' konce mRNA (Bouveret *et al*, 2000, Tharun *et al*, 2000). Funkce komplexu Lsm1-Lsm7 s Pat1 byla následně rozšířena na schopnost stabilizace 3' poly(A) konců transkriptů. Po delecí genů kódujících Lsm 1-7 (*Lsm1*, 2, 5, 6 a 7) a Pat1 (*Pat1*) byly 3' konce transkriptů zkráceny o 10-20 nukleotidů (He a Parker, 2001, Tharun *et al*, 2005). Bez experimentálního povšimnutí nezůstal ani specifický 5' poly(A) konec transkriptů poxvirů, kam spadá i virus *Vaccinie*. V buňkách infikovaných poxviry byla pozorována cca 2x vyšší stabilita transkriptů obsahujících 21 adenosinů na 5' konci než u transkriptů bez těchto adenosinů, ale po delecí *Lsm1* byl poločas rozpadu 5' polyadenylovaných transkriptů cca 3x rychlejší. Komplex Lsm1-Lsm7 tedy interaguje nejen s 3' konci mRNA transkriptů, ale také s jejich 5' poly(A) sekvencemi, čímž je pravděpodobně stabilizují (Bergman *et al*, 2007). Na základě těchto poznatků byl studován vliv Lsm1 na expresi otevřených čtecích rámců pGKL plasmidů kódujících *killer* toxin v kmeni *K. lactis Lsm1Δ*. Následné analýzy potvrdily negativní vliv Lsm1 na translaci mRNA pGKL plasmidů, které vykazovaly vyšší míru exprese v kmeni s delecí *Lsm1* (Vopálenský *et al*, 2019).

3 CÍLE PRÁCE

Hlavním cílem této diplomové práce byla konstrukce specifického reportérového systému sloužícího pro charakterizaci a objasnění iniciace translace transkriptů pocházejících z lineárních plasmidů kvasinky *Kluyveromyces lactis*.

Cíl 1:

Konstrukce kvasinkového reportérového plasmidu obsahujícího dva reportérové geny, z nich je každý pod kontrolou jiného konstitutivního promotoru a následné určení transkripčního startu (TSS) pomocí 5' RACE PCR u mRNA kódujících tyto reportérové geny. Souběžně bude stanovena míra exprese obou reportérů.

Cíl 2:

Konstrukce dvou reporterových kazet v plasmidu pGKL1. Jedna kazeta bude obsahovat reportérový gen pod kontrolou promotoru produkující transkripty s netemplátově přidanými adenosinovými zbytky na 5' koncích mRNA a bez N⁷ methylguanosinové čepičky, druhá kazeta bude obsahovat reportérový gen pod kontrolou promotoru produkující transkripty bez netemplátově přidaných adenosinových zbytků na 5' koncích mRNA a s N⁷ methylguanosinou čepičkou na 5' konci mRNA. Rovněž bude stanovena síla obou použitých promotorů.

4 MATERIÁL A METODY

4.1 MATERIÁL

4.1.1 Použité chemikálie

Název	Výrobce	Zkratka/Vzorec
8-hydroxychinolin	Lachema	
β-merkapt ethanol	Sigma	
adenin	ANGUS	
agarosa	Invitrogen / Serva	
ampicilin	Sigma / Spofa	AMP
bromfenolová modř	Merck	
deionizovaná voda		ddH ₂ O
deoxyribonukleosidtrifosfáty	Roche / Fermentas	dNTP
destilovaná voda		dH ₂ O
dithiotreitol	AMRESCO	DTT
dodecylsírán sodný	Serva	SDS
ethanol	Lach-Ner	
ethidium bromid	Sigma	EtBr
fenol	Merck	
fenylmethylsulfonyl fluorid	Sigma	PMSF
foramamid	Sigma	
G418	Sigma / Amersham	
glycerol	Lach-Ner / Sigma	
hexanukleotidové primery	Invitrogen	
hydroxid sodný	Lachema	NaOH
hygromycin B Gold TM	InvivoGen	HygB
chlorid cesný	ANGUS	CsCl
chlorid hořečnatý	Sigma	MgCl ₂
isoamylalkohol	Lachema	
isopropanol	Lach-Ner	
isopropyl-β-D-thiogalaktosid	Sigma / Fermentas	IPTG

jednovláknová DNA z lososího mlíčí	Roche / Sigma	ssDNA
kvasničný autoizolát	ForMedium™	
kyselina ethylendiamintetraoctová	Serva	EDTA
kyselina chlorovodíková	ICN / Lachema	HCl
L-histidin	Serva	
L-leucin	ANGUS	
L-lysin	Nutritional Biochemicals Co.	
L-methionin	Merck	
L-tryptofan	Reanal	
octan draselný	Sigma	KAc
octan litný	Sigma	LiAc
octan sodný	Sigma	NaAc
pepton	ForMedium™	
polyethylenglykol 4000	Serva	
sacharosa	Serva	
síran amonný	Lach-Ner	(NH ₄) ₂ SO ₄
TRI Reagent® Solution	Ambion	
tris(hydroxymethyl)-aminomethan	ANGUS / Serva	Tris
uracil	Sigma	
X-Gal	Sigma	

4.1.2 Roztoky a pufry

Roztoky připravené v laboratoři	Složení
6x vzorkový pufr pro agarózovou elektroforézu	60 mM EDTA-NaOH; 60 % glycerol; 0,03 % bromfenolová modř; 10 mM Tris-HCl (pH=7,6)
50x pufr TAE	10 % 05 M EDTA-NaOH (pH=8); 5,7 % ledová kyselina octová; 24,2 % Tris
fenol (použitý při izolaci DNA)	vodou nasycený fenol obohacený 50 mM Tris-HCl na pH=8; 0,1 % β-merkapt ethanol; 0,1 % 8-hydroxy chinolin

chloroform (použitý při izolaci DNA)	chloroform obohacený isoamylalkoholem v poměru 24:1
PEG	50 % polyethylenglykol 4 000
PMSF v roztoku	100 mM PMSF v isopropanolu
roztok I	50 mM glukosa; 10 mM EDTA-NaOH; 25 mM Tris-HCl (pH=8)
roztok II	0,2 M NaOH; 1 % SDS
roztok III	11,5 % kyselina octová; 3 M KAc
STET	1 % Triton X-100; 50 mM EDTA-NaOH; 50 mM Tris-HCl (pH=8); 10 % sacharosa
TESP	2 % SDS; 50 mM EDTA-NaOH (pH=8); 20 mM Tris-HCl (pH=8)
Tris-HCl	roztok Tris upraven pomocí HCl na požadované pH
TRN	0,045 mM NaCl; 0,1 mM Tris-HCl (pH=7,5); 110 mg/ml ribonukleáza A
X-Gal v roztoku	20 mg/ml X-Gal v DMSO

Komerční pufry	Složení	Výrobce
pufr pro deoxyribonukleázu I	0,5 mM CaCl ₂ ; 2,5 mM MgCl ₂ ; 10 mM Tris-HCl (pH=7,5)	Ambion
pufr pro poly(A)polymerázu	250 mM NaCl; 50 mM Tris-HCl (pH=7,9)	Applied Biosystems
pufr pro restrikční endonukleázy Orange	0,1 mg/ml BSA; 10 mM MgCl ₂ ; 100 mM NaCl; 50 mM Tris-HCl (pH=7,5 při 37 °C)	Fermentas

pufr pro restrikční endonukleázy Red	0,1 mg/ml BSA; 10 mM MgCl ₂ ; 100 mM KCl; 10 mM Tris-HCl (pH=8,5 při 37 °C)	Fermentas
pufr pro restrikční endonukleázy Yellow	0,1 mg/ml BSA; 10 mM octan hořečnatý; 60 mM KAc; 33 mM Tris-octan (pH=7,9 při 37 °C)	Fermentas
pufr pro SAP fosfatázu	0,1 mg/ml BSA; 10 mM MgCl ₂ ; 10 mM Tris-HCl (pH=7,5 při 37 °C)	Fermentas
pufr pro SuperScript IV™	50 mM Tris-HCl (pH=8.3); 4 mM MgCl ₂ ; 50 mM KCl	Invitrogen
Pufr pro T4 DNA ligázu	0,5 mM ATP; 10 mM DTT; 10 mM MgCl ₂ ; 4 mM Tris-HCl (pH=7,8 při 25 °C)	Fermentas
pufr pro Taq DNA polymerázu	1,5 mM MgCl ₂ ; 50 mM KCl; 10 mM Tris-HCl (pH=8,3 při 20 °C)	Roche
pufr pro terminální deoxyribonukleotidyltransferázu	0,25 mg/ml BSA; 200 mM kakodylát draselný; 25 mM Tris-HCl (pH=6,6 při 25 °C)	Roche / Fermentas

4.1.3 Živná média

4.1.3.1 Tekutá média

- **2x TY:** 0,5 % NaCl; 1 % kvasničný autoizolát; 1,6 pepton; NaOH na úpravu pH=7 (bakteriální médium)
- **2x TY se selekčními antibiotiky:** 0,5 % NaCl; 1 % kvasničný autoizolát; 1,6 pepton; NaOH na úpravu pH=7; ampicilin o konečné koncentraci 100 µg/ml (bakteriální médium)

- **YPD:** 2 % glukosa; 1 % pepton; 0,5 % kvasniční autoizolát (kvasinkové médium)
- **YPD + G418:** 2 % glukosa; 1 % pepton; 0,5 % kvasniční autoizolát; G418 (250 µg/ml) (kvasinkové médium)
- **YPD + HygB:** 2 % glukosa; 1 % pepton; 0,5 % kvasniční autoizolát; HygB (200 µg/ml) (kvasinkové médium)

4.1.3.2 Pevné půdy

- **2x TY:** 2x TY médium; 2 % agar (bakteriální médium)
- **2x TY se selekčním antibiotikem:** 2x TY médium; 2 % agar; ampicilin (konečná koncentrace 100 µg/ml) (bakteriální médium)
- **SD-:** 0,2 % glukosa; 0,5 % (NH₄)₂SO₄; 0,174 % Yeast Nitrogen Base; 2 % agar (kvasinkové médium)
- **SD+:** 0,2 % glukosa; 0,5 % (NH₄)₂SO₄; 0,174 % Yeast Nitrogen Base; 2 % agar; 0,003 % uracil (U); 0,003 % L-tryptofan (T); 0,003 % L-methionin (M); 0,003 % L-lysin (K); 0,003 % L-leucin (L); 0,003 % L-histidin (H); 0,003 % adenin (A) (kvasinkové médium)
- **selekční média:** SD+ bez přidané konkrétní aminokyseliny (jedné i více) (kvasinkové médium)
- **YPDA:** 2 % glukosa; 1 % pepton; 0,5 % kvasniční autoizolát; 2 % agar (kvasinkové médium)
- **YPDA + G418:** 2 % glukosa; 1 % pepton; 0,5 % kvasniční autoizolát; G418 (500 µg/ml); 2 % agar (kvasinkové médium)
- **YPDA + HygB:** 2 % glukosa; 1 % pepton; 0,5 % kvasniční autoizolát; HygB (200 µg/ml či 300 µg/ml); 2 % agar (kvasinkové médium)

4.1.4 Enzymy

Název	Výrobce	Zásobní koncentrace
Deoxyribonukleáza I	Invitrogen / Ambion	2 U/ μ l
Klenowův fragment DNA polymerázy I	Fermentas	10 U/ μ l
Lysozym	Serva	500 U/mg
Pfu DNA polymeráza	Fermentas	2,5 U/ μ l
Pronáza E	Roche / Serva	6 U/mg
Poly(A)polymeráza	Applied Biosystems	2 U/ μ l
Restrikční endonukleázy	NEB / Fermentas	10 U/ μ l
Shrimp alkaline phosphatase (SAP)	Fermentas	1 U/ μ l
SuperScript IV TM reverzní transkriptáza	Invitrogen	200 U/ μ l
T4 DNA ligáza	Fermentas	5 Weiss U/ μ l
Taq DNA polymeráza	Roche / Fermentas	1 U/ μ l; 5 U/ μ l
Taq DNA polymeráza FastStart TM	Roche	5 U/ μ l
TdT	Roche / Fermentas	400 U/ μ l

4.1.5 Komerční soupravy

- **DNA Clean ConcentratorTM -5** od Zymo Research
- **FavorPrepTM GEL/PCR Purification Kit** od Favorgen
- **FavorPrepTM Plasmid Extraction Mini Kit** od Favorgen
- **FastStartTM PCR Master** od Roche
- **High Pure PCR Product Purification Kit** od Roche
- **TOPO[®] TA Cloning[®] Kit** od Invitrogen

4.1.6 Plasmidy

Název	Původ
pCR TM 4-TOPO	Invitrogen
pCEV-G1-Ph	Vickers <i>et al</i> , 2013
pcDNA5/FRT/EF1 α /R_IRES _{opr} _L	Václav Vopálenský
pcDNA5/FRT/TO_R_L	Václav Vopálenský

pcDNA_FRT_EF1 α _R_L_A4K	Václav Vopálenský
pGKL1	Gunge <i>et al</i> , 1981
pGKL2	Gunge <i>et al</i> , 1981
pUG6	Güldener <i>et al</i> . 1996
TOPO_RLuc_Paq_Xma_3-5	Tomáš Mašek

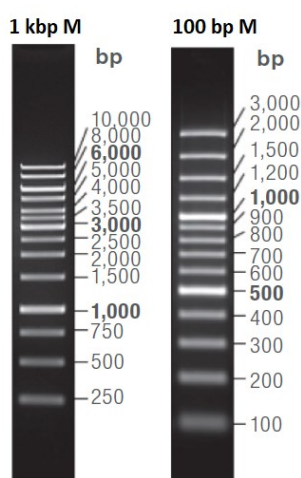
4.1.7 Primery a oligonukleotidy

Název	Sekvence
5_RACE_04_K1	TCCATTAAATCCAGAGTTATTCTTTC
5_RACE_03_K1_2	GTATCTTCTTCGCAAAAAGATCTTC
FL2rev4	CTGATGCCCATGCTGTTCA
FLuc_BamHI	ATGGATCCATGGAAGATGCCAAAAACAT
FLuc_HindIII	CGTACAAGCTTTTACACGGCGATCTTGCCG
Fluc_Seq_rev	AGGTAATGTCCACCTCGATA
G_BD_Forw	ACCTACAGGAAAGAGTT
Hygro tail	ACGGCAATTTTCGATGATGCAG
K08	CAACTCTGTATAACAAGTCT
K1_UCS2_RLuc_F2	ATATATGAAAGTTTTTATAATAATTATAAAATGGCT TCGAAAGTTTATGATCCAG
K1_UCS2_RLuc_R1	TTTATAATTATTATAAAAACTTTCATATATTAAGTA GCTTTCACGGTCTTTATTCCTTTGCCCTCGGACGAG TGCTGGGG
K1_UCS8_RLuc_F2	TTTTATATTTGAATTCTACTTTATGCTCAATAATCTC CATAATGGCTTCGAAAGTTTATGATCCAG
K1_UCS8_RLuc_R1	TATGGAGATTATTGAGCATAAAGTAGAATTCAAAT ATAAAATTATTCCTTTGCCCTCGGACGAGTGCTGGG G
K1_UCSx_RLuc_R2	TAACAAACACTAAATATATGATATATCTTCATTTTA ATTAAAAATGTGTTTAGAATTAGATAATAATCTTTC AGATTTATTGTTCATTTTTGAGAACTCG
Oligo(2dC)anchor	GACCACGCGTATCGATGTCGACCCCCCCCCCCC

Ologo(dG)anchor2	GATTGAGGTGTATCTGATGTCGAGGGGGGGGGGGG
RLuc_3_Seq	GAAGGTGCCAAGAAGTTT
RLuc_5_Seq	CTGCATGTTTTTCTGAATC
T7 promotor primer	TAATACGACTCACTATAGGG

4.1.8 Hmotnostní markery

- GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder od Fermentas
- GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder od Thermo Fisher Scientific



Obr. 8: Standardy molekulových hmotností. 1 kbp M představuje marker GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder od Thermo Fisher Scientific a 100 bp M marker GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder od Fermentas. Čísla udávají velikost fragmentů DNA v bp.

4.1.9 Bakteriální a kvasinkové kmeny

	Charakteristika	Původ
Bakteriální kmeny		
<i>E. coli</i> XL-1 Blue	<i>endA1 gyrA96(nalR) thi-1 recA1 relA1 supE44 lac [F' Tn10(tetR) proAB lacIqΔ (lacZ)M15] hsdR17(rK-mK+)</i>	Stratagene
Kvasinkové kmeny		
<i>K. lactis</i> IFO1267	MATa pGKL1 ⁺ pGKL2 ⁺	Institut pro fermentaci, Osaka

<i>K. lactis</i> IFO1267_pRKL1-9	MATa pRKL1-9+ (K1UCR4 se dvěma bodovými mutacemi v UCS4-ORF4, HygBR) pGKL2+	Sýkora <i>et al</i> , 2018
<i>S. cerevisiae</i> YAT	kmen ρ^0 bez mitochondriální DNA	dostupný v Laboratoři biochemie RNA UK
<i>S. cerevisiae</i> pJ69a	MATa <i>trp1-901 leu2-3,112</i> <i>ura3-52 his3-200 gal4</i> <i>gal80 LYS2::GAL1-HIS3</i> <i>GAL2-ADE2 met2::GAL7-</i> <i>lacZ</i>	James <i>et al</i> , 1996

4.2 METODY

4.2.1 Manipulace s DNA

4.2.1.1 Izolace DNA

4.2.1.1.1 Minipreparace plasmidové DNA z bakterií *E. coli*

Klony *E. coli* vybrané pro analýzu byly přečárkovány na agarózovou plotnu (2x TY) s vhodným selekčním antibiotikem a inkubovány přes noc při 37°C. Pomocí párátko byla narostlá biomasa přenesena a resuspendována v 400 µl roztoku STET s 5 µl 5% lysozymu. Celá směs byla dokonale promíchána a inkubována 5 minut v 95°C. Směs se nechala vychladnout při laboratorní teplotě a proběhla centrifugace po dobu 10 minut, při 14 000 g a pokojové teplotě. Vzniklý pelet byl odstraněn za pomoci párátko a k supernatantu bylo přidáno 450 µl vychlazeného isopropanolu (4°C). Směs byla inkubována v -20°C 30 minut a centrifugována 15 minut při 14 000 g a pokojové teplotě. Sediment byl promyt v 1 ml 70% ethanolu. Poté proběhla další centrifugace při 14 000 g po dobu 10 minut a pokojové teplotě. Supernatant byl odstraněn a pelet se nechal vyschnout v termostatu při 37°C cca 20 minut. Následně byl pelet rozpuštěn v 30 µl TE pufru. 5 µl vzorku bylo ověřeno elektroforeticky.

4.2.1.1.2 Minipreparace plasmidové DNA z kvasinkové kultury

Na vhodnou agarózovou plotnu se selekčním antibiotikem (YPDA + G418 o koncentraci 500 µg/ml, YPDA + HygB o koncentraci 200 či 300 µg/ml) byla přečárkována kvasinková kultura nesoucí požadovaný plasmid a nechala se růst 2-3 dny při 28°C. Narostlé kvasinky o velikosti cca špendlíkové hlavičky byly pomocí sterilního párátko přeneseny do jamky mikrotitrační 96 jamkové destičky. Destička s přenesenými kvasinkami byla inkubována v hybridizační peci při teplotě 45°C po dobu 2 hodin. K buňkám bylo do jamek přidáno 40 µl pufru TESP s pronásou E (o finální koncentraci 0,5 mg/ml). Destička byla s kvasinkami inkubována v třepačce pro mikrotitrační destičky PST-60HL (BIOSAN Ltd.) po dobu 1 hodiny a při 800 otáčkách za minutu. Poté proběhla inkubace přes noc při teplotě 37°C. K buňkám bylo přidáno do jednotlivých jamek 30 µl

ddH₂O s 3 µl 1x nanášecího pufru. Proběhla inkubace v třepačce PST-60HL (BIOSAN Ltd.) po dobu 2 hodin a při 800 otáčkách za minutu. 10 µl vzorku bylo analyzováno elektroforeticky.

4.2.1.1.3 Minipreparace plasmidové DNA z bakterií *E. coli* za využití soupravy FavorPrep™ Plasmid Extraction Mini Kit

Bakteriální kultura nesoucí požadovaný plasmid rostla přes noc ve 3 ml média 2xTY s příslušným selekčním antibiotikem při 37°C. Kultura byla centrifugována při pokojové teplotě a 14 000 g po dobu 1 minuty. Vzniklý pelet byl resuspendován ve 200 µl pufru FAPD1 s přidanou ribonukleázou A. Následně bylo přidáno 200 µl pufru FAPD2 a směs byla promíchána otáčením zkumavky (zkumavka byla otočena cca 10x). Směs byla inkubována 2–4 minuty při pokojové teplotě. Ke směsi bylo přidáno 300 µl pufru FAPD3, zkumavka byla promíchána otáčením (cca 10x), inkubována 1 minutu při pokojové teplotě a centrifugována 5 minut při 14 000 g a pokojové teplotě. Supernatant byl přenesen do dodaných kolonek a proběhla centrifugace po dobu 1 minuty při 14 000 g a pokojové teplotě. Proteklý supernatant byl odstraněn a do zkumavky bylo přidáno 400 µl W1 pufru. Proběhla centrifugace po dobu 1 minuty a 14 000 g při pokojové teplotě. Proteklý supernatant byl odstraněn a do zkumavky bylo přidáno 700 µl W1 pufru. Proběhla centrifugace po dobu 1 minuty a 14 000 g při pokojové teplotě. Proteklý supernatant byl odstraněn a proběhla centrifugace po dobu 2 minut při 18 000 g a pokojové teplotě. Kolonka byla nasazena na čistou mikrozkušavku a bylo do ní přidáno 50 µl ddH₂O. Proběhla centrifugace po dobu 2 minut, při 14 000 g a pokojové teplotě.

4.2.1.1.4 Midipreparace plasmidové DNA z bakterií *E. coli*

Bakteriální kultura nesoucí požadovaný plasmid rostla přes noc v 50 ml média 2xTY s příslušným selekčním antibiotikem při teplotě 37°C. Kultura byla centrifugována 10 minut při 5 000 g a pokojové teplotě. Supernatant byl odstraněn a buňky byly resuspendovány ve 2 ml roztoku I. Ke směsi byly přidány 4 ml roztoku II a zkumavka byla promíchána otáčením. Směs byla inkubována po dobu 5 minut při pokojové teplotě. Ke směsi byly přidány 3 ml roztoku III, zkumavka byla promíchána otáčením a inkubována 20 minut na ledu. Následovala centrifugace po dobu 20 minut při 5 000 g a 4°C. Supernatant byl přefiltrován přes gázu do nové zkumavky za přidání 0,7 objemu isopropanolu. Směs

byla dokonale promíchána a inkubována 10 minut na ledu. Proběhla centrifugace po dobu 20 minut při 5 000 g a teplotě 4°C. Supernatant byl odstraněn a pelet resuspendován ve 3 ml 70% ethanolu. Směs byla centrifugována 5 minut při 5 000 g. Supernatant byl odstraněn a pelet se nechal vyschnout při 37°C v termostatu. Následně byl rozpuštěn v 500 µl TE pufru s 10 µl TRN. Směs byla inkubována 1 hodinu při 37°C. Ke směsi bylo přidáno 500 µl fenolu (pH=8) a došlo k dokonalému promíchání. Dvě fáze od sebe byly odděleny centrifugací trvající 10 minut, při 14 000 g a pokojové teplotě. Horní vodná fáze byla přemístěna do nové zkumavky a bylo k ní přidáno 200 µl fenolu (pH=8) a 200 µl chloroformu. Směs byla promíchána a centrifugována jako v předchozím kroku. Po centrifugaci byla odebrána horní vodná fáze do nové zkumavky a bylo k ní přidáno 350 µl chloroformu. Směs byla centrifugována stejně jako v předchozích krocích. Vodná horní fáze byla opět odebrána a přemístěna do nové zkumavky. Objem odebrané fáze byl změřen. K fázi bylo přidáno 0,1 objemu NaAc a 2,5 objemu 96% ethanolu vychlazeného při 4°C. Směs byla promíchána a inkubována přes noc při -20%. Poté proběhla centrifugace po dobu 10 minut, při 14 000 g a pokojové teplotě. Supernatant byl dokonale odstraněn a pelet byl vysušen při 37°C. Poté byl pelet rozpuštěn v 300 µl TE pufru. Z izolace byly 1 µl a 5 µl analyzovány elektroforeticky.

4.2.1.1.5 Izolace plasmidové DNA z kvasinkových buněk pro reakci PCR

Kvasinky nesoucí požadovaný vektor byly přečárkovány na agarózovou YPDA plotnu s vhodným selekčním antibiotikem (YPDA + G418 o koncentraci 500 µg/ml, YPDA + HygB o koncentraci 200 µg/ml). Kvasinky se nechaly růst 1–2 dny při 28°C. Následně bylo pomocí pipetovací špičky přeneseno 5–10 µl do zkumavky s 50 µl 20 mM NaOH. Směs byla dokonale promíchána a inkubována při 95°C po dobu 20 minut. Poté byla směs po dobu 5 minut schlazena na ledu a opět inkubována 20 minut při 95°C. Dále proběhla centrifugace po dobu 5 minut, při 14 000 g a pokojové teplotě. Pro PCR reakci byl použit 1 µl supernatantu.

4.2.1.1.6 Izolace komplementární DNA (cDNA) po reverzní transkripci za využití soupravy High Pure PCR Product Purification Kit

K 20 µl směsi po reverzní transkripci bylo přidáno 100 µl dodaného *binding* pufru, směs byla dokonale promíchána a přenesena do dodané kolonky se skleněnou fritou.

Proběhla centrifugace po dobu 30 sekund, při 7 000 g a pokojové teplotě. Proteklý supernatant byl odstraněn a na kolonku bylo přidáno 500 μ l dodaného W1 pufru. Centrifugace byla zopakována a proběhla za stejných podmínek jako v předešlém kroku. Proteklý supernatant byl odstraněn a na fritu bylo napipetováno 200 μ l W1 pufru. Proběhla centrifugace po dobu 2 minut, při 13 000 g a pokojové teplotě. Proteklý supernatant byl odstraněn a skleněná frita byla přenesena na novou 1,5 ml zkumavku. Na fritu bylo přidáno 50 μ l ddH₂O, eluční činidlo se nechalo působit po dobu 1 minuty a při pokojové teplotě. Eluce proběhla centrifugací po dobu 30 sekund, při 7 000 g a pokojové teplotě. 35,5 μ l vzorku bylo využito pro syntézu homopolymerního 3' konce cDNA.

4.2.1.1.7 Izolace fragmentů DNA z agarózového gelu za využití soupravy FavorPrep™ GEL/PCR Purification Kit

Vzorky byly separovány elektroforézou v 0,5% agarózovém gelu. Gel byl následně přenesen na transluminátor, který byl schopný generovat UV záření o vlnové délce 312 nm. Z gelu byly vyříznuty sterilním skalpelem fragmenty o požadované velikosti. Fragmenty byly přeneseny do 1,5 ml zkumavek za přidání 500 μ l pufru FADF. Vzorky byly inkubovány 10 minut při teplotě 55°C. Během inkubace byly několikrát důkladně promíchány. Po rozpuštění gelu s fragmentem DNA byly vzorky přeneseny do dodané kolonky se skleněnou fritou. Proběhla centrifugace po dobu 1 minuty, při 14 000 g a pokojové teplotě. Proteklý supernatant byl odstraněn a na kolonku bylo napipetováno 700 μ l dodaného W1 pufru. Proběhla centrifugace po dobu 1 minuty, při 14 000 g a pokojové teplotě. Proteklá tekutina byla ze zkumavky odstraněna. Pro dokonalé vysušení kolonky proběhla centrifugace po dobu 3 minut, při maximálních otáčkách a pokojové teplotě. Kolonka byla přenesena na novou 1,5 ml zkumavku. Eluce DNA proběhla pomocí 40 μ l ddH₂O a centrifugace, která proběhla při pokojové teplotě, 14 000 g a trvala 1 minutu. 5 μ l vzorku bylo ověřeno elektroforeticky.

4.2.1.1.8 Přečištění ligační směsi za využití soupravy DNA Clean & Concentrator™ - 5

Ligační směs byla doplněna ddH₂O do celkového objemu 100 μ l. Ke směsi bylo přidáno 200 μ l *DNA Binding Buffer*, který byl součástí kitu, a došlo k dokonalému promíchání. Směs byla přenesena do dodané kolonky se skleněnou fritou a proběhla

centrifugace po dobu 30 sekund, při 14 000 g a pokojové teplotě. Proteklá tekutina byla ze zkumavky odstraněna a na kolonku bylo přidáno 200 µl dodaného pufru DNA W1 pufr. Po další centrifugaci, která trvala 30 sekund, při 14 000 g a pokojové teplotě, byl supernatant odstraněn a promývací krok byl zopakován. Následně byla skleněná frita přenesena na novou 1,5 ml zkumavku. Do frity bylo přeneseno 6 µl ddH₂O a proběhla centrifugace po dobu 1 minuty, při 14 000 g a pokojové teplotě. Po centrifugaci obsahovala zkumavka přečištěnou ligační směs vhodnou k transformaci do *E. coli* buněk elektroporací.

4.2.1.2 Stanovení koncentrace DNA a RNA

Čistota a koncentrace DNA a RNA byla ověřována spektrofotometricky pomocí mikrokapilárního spektrofotometru NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer (NanoDrop Technologies). K tomuto stanovení byl použit 1,5 µl vzorku.

4.2.1.3 Agarózová elektroforéza DNA

Byla využita agarózová elektroforéza s koncentrací agarózy v rozmezí 0,5% - 1%, která byla rozpuštěna v 1x TAE pufru. Nádoba s agarózou a pufrem byla zahřáta do plného rozpuštění agarózy a následně schlazena na teplotu okolo 60°C. K takto připravené agaróze byl přidán EtBr (o výsledné koncentraci 0,1 µg/ml). Dále byla sestavena vanička s hřebenem, do které byla přelita agaróza. Po ztuhnutí agarózy byl vytáhnut hřebínek a vanička byla přemístěna do elektroforetického přístroje a celý gel byl zalit 1x pufrem TAE. Do jamek byla nanášena DNA o objemu 1-30 µl dle potřeby. DNA byla předem smíchaná se vzorkovým barvivem. Do jedné z jamek byl dále nanášen marker molekulových hmotností. Separace proběhla pomocí zapojení elektrického pole s konstantním napětím 1V/cm - 8V/cm, které působilo po dobu 1-24 hodin. Gel byl následně v případě potřeby dobarven ve vaně s EtBr o výsledné koncentraci 2 µg/ml po dobu 3 hodin. Gel bylo třeba následně omýt dH₂O. Výsledný gel byl přenesen na transluminátor schopným vytvořit UV záření s vlnovou délkou 254 nm a byl vyfocen pomocí přístroje Gel Logic 112 Imaging System (Kodak). Analýza proběhla pomocí programu Carestream (Kodak).

4.2.1.4 Restrikční štěpení DNA

4.2.1.4.1 Štěpení vektorů a produktů PCR za účelem přípravy nových rekombinantních vektorů

Pro štěpení byly využity vektory izolované metodou 4.2.1.1.4 či metodou 4.2.1.1.1. Množství štěpené DNA bylo odhadnuto z elektroforeogramu. K DNA byly přidány následující komponenty reakce: 1 μl každého enzymu (10 U/ μl), 3 μl nebo 6 μl pufru vhodného pro příslušné enzymy a ddH₂O v objemu doplňujícím 30 μl . Reakce byla dokonale promíchána a krátce stočena po dobu 10 sekund, při 14 000 g a pokojové teplotě. Následně proběhla inkubace reakce v 37°C po dobu 2–6 hodin. Celý objem reakce byl smíchán s 6x nanášecí barvou a byl přenesen do jamky 0,5% agarózového gelu. Po elektroforetické separaci štěpených fragmentů proběhla izolace příslušného fragmentu metodou 4.2.1.1.7.

4.2.1.4.2 Štěpení nově vytvořených rekombinantních vektorů vzniklých ligací či TOPO® TA klonováním za účelem ověření správného uspořádání konstruktu

Pro štěpení byly použity připravené vektory či konstrukty v množství odhadnutém pomocí elektroforetické analýzy. K DNA byly přidány komponenty reakce: 1 μl od každého enzymu, 3 μl vhodného pufru, 0,5 μl TRN a ddH₂O v množství doplňujícím objem do 30 μl . Reakce byla promíchána a centrifugována po dobu 10 sekund, při 14 000 g a pokojové teplotě. Následně proběhla inkubace ve 37 °C po dobu 3 hodin. Z reakce bylo 10 μl smícháno s 6x vzorkovým pufrem a ověřeno elektroforeticky na 0,8–1 % agarózovém gelu.

4.2.1.4.3 Úprava štěpených konců DNA za použití Klenowova fragmentu DNA polymerázy I

Po štěpení (4.2.1.4.1) některých molekul DNA (vektorů i inzertů) bylo zapotřebí upravit konce molekul tak, aby byly tupé bez přesahů. K zatupení bylo použito 10 μl DNA, 0,5 μl 2 mM dNTP, 0,5 μl Klenowova fragmentu DNA polymerázy I, 1,5 μl pufru (byl použit vhodný pufr primárně určený pro restrikční endonukleázy) a reakce byla doplněna

ddH₂O do 15 µl. Následně proběhla inkubace 15 minut při 37°C a 10 minut při 75°C. DNA byla připravena pro další použití.

4.2.1.5 Defosforylace štěpených vektorů

Za účelem zvýšení frekvence pozitivních klonů proběhla defosforylace štěpených vektorů. Pro defosforylaci bylo použito: odhadnuté množství vektoru (množství bylo odhadnuto pomocí elektroforetické analýzy provedené po restričním štěpení vektoru), 1,5 µl pufru pro SAP fosfatázu, 1 µl SAP fosfatázy a ddH₂O doplňující objem do 20 µl. Reakce byla promíchána a centrifugována po dobu 10 sekund, při 14 000 g a pokojové teplotě. Dále proběhla inkubace v termocykleru (MiniCyclerTM od MJ Rsearch) při 37°C po dobu 45 minut a při 75°C po dobu 20 minut. Po defosforylaci následovala ligační reakce.

4.2.1.6 Ligační reakce

Pro ligační reakci byly použity vektor a inzert, které byly předem naštěpeny vhodnými restričními endonukleázami (4.2.1.4.1). Množství vektoru a inzertu bylo odhadnuto pomocí elektroforeogramu provedeném po štěpení. Defosforylovaného vektoru bylo použito 5 µl. Komponenty reakce: 2 µl T4 DNA ligázy, 3 µl pufru pro T4 DNA ligázu a ddH₂O doplňující objem do 20 µl. Ligační reakce byla dokonale promíchána a centrifugována po dobu 10 sekund, při 14 000 g a pokojové teplotě. Dále byla inkubována v termocykleru (MiniCyclerTM od MJ Rsearch) po dobu 16 hodin při 16°C a 15 minut při 65°C. Z ligační reakce bylo následně použito 5–8 µl pro transformaci kompetentních bakterií *E. coli* metodou (4.2.1.10.1). V případě potřeby byla před transformací ligační směs přečištěna metodou (4.2.1.1.8).

4.2.1.7 Klonování DNA za využití soupravy TOPO[®] TA Cloning[®] Kit

Produkt 5' či 3' RACE PCR byl izolován z elektroforetického gelu metodou (4.2.1.1.7), z této izolace byly pro TOPO[®] TA klonování použity 4 µl PCR produktu. K PCR produktu byly přidány: 1 µl 4x salt solution pufru, 0,5 µl pCRTM 4-TOPO[®] vektoru a reakce byla doplněna ddH₂O do celkového objemu 6 µl. Reakce byla promíchána a proběhla inkubace po dobu 30 minut při laboratorní teplotě. Poté bylo k reakci přidáno 18

μl ddH₂O do celkového objemu 24 μl. 5 μl bylo použito pro transformaci buněk *E. coli* elektroporací. V případě potřeby byla směs přečištěna pomocí metody (4.2.1.1.8) a 5 μl bylo rovněž použito pro transformaci.

4.2.1.8 Syntéza homopolymerního 3' konce komplementární DNA (cDNA)

Bylo použito 35,5 μl cDNA, která byla dříve izolovaná metodou (4.2.1.1.6). K cDNA bylo přidáno 10 μl 5x TdT pufru bez CoCl₂ a 2,5 μl 10 mM dGTP. Směs byla důkladně promíchána a inkubována v termocykleru (MiniCyclerTM od MJ Rsearch) při 94°C po dobu 3 minut. Následně proběhlo ochlazení na ledu a centrifugace při 14 000 g a pokojové teplotě po dobu 10 sekund. K reakci byly přidány 2 μl terminální deoxyribonukleotidyltransferázy (TdT). Reakce byla promíchána a inkubována v termocykleru při 37°C po dobu 30 minut a při 70°C po dobu 10 minut. Pro následnou 5' RACE-PCR (4.2.1.9) bylo použito 2,5 μl.

4.2.1.9 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Složení směsi pro PCR reakci

DNA polymeráza: Taq DNA polymeráza (použitá pro analytické PCR reakce), Taq DNA polymeráza FastStartTM (použitá pro 5' a 3' RACE PCR), Taq DNA polymeráza + 2,5% Pfu DNA polymeráza nebo 1-5% Pwo DNA polymerázy (použitá při PCR reakcích sloužících pro syntézu reportérových kazet a pro analytickou PCR). Použitý objem: 0,3 – 1 μl.

Pufr: 10x Pufr pro příslušné DNA polymerázy. Objem: 2,5 μl.

Ostatní komponenty: 10 μM primer 1 (1,25 μl), 10 μM primer 2 (1,25 μl), templátová DNA (1 μl), 10 mM dNTP (0,5 μl), ddH₂O (do celkového objemu 25 μl).

Všechny komponenty směsi pro PCR byly při přípravě reakce udržovány na ledě. Výsledná reakční směs byla promíchána a centrifugována po dobu 10 sekund při 14 000 g a pokojové teplotě. PCR reakce proběhla pomocí inkubace v termocykleru Mastercycler[®] ep Gradient S (Eppendorf) s vhodně zvoleným programem. 10 μl výsledné PCR reakce bylo analyzováno elektroforeticky.

Program

95 °C	5–7 min	30–35 cyklů
94 °C	30 s	
45–55 °C (variabilní)	40 s	
72 °C	40s–4 min (variabilní)	
72 °C	10 min	
4 °C	do odvolání	

4.2.1.9.1 Fúzní PCR použitá pro tvorbu reportérových kazet

Pro tvorbu reportérových kazet byla použita fúzní PCR, a to ve třech krocích. První i druhá PCR reakce proběhla za použití primerů o délce více než 40 nukleotidů s nekomplementárními 5' konci zanášejícími do výsledného amplikonu sekvenci komplementární k druhé části kazety, proto bylo zapotřebí upravit čas prodlužování řetězce na 3–4 minuty. Program PCR reakce se jinak neměnil (viz kapitola 4.2.1.9). Po získání dvou částí kazety, tedy dvou fragmentů DNA s překrývajícími se 3' konci, jež si sloužily jako primery při třetí PCR reakci, proběhla další PCR reakce, za přítomnosti primerů ohraničujících kazetu. Program je popsán v kapitole 4.2.1.9.

4.2.1.10 Transformace DNA do mikroorganismů**4.2.1.10.1 Transformace bakterií *E. coli* elektroporací**

Do vychlazené elektroporační kyvety s elektrodovou vzdáleností 2 mm byly vneseny elektrokompetentní bakterie *E. coli* smíchané s 2–6 µl transformované DNA o přibližné koncentraci 100 ng. Na buňky v kyvetě byl aplikován puls elektroporátorem Gene Pulser Xcell™ (BIO-RAD) o kapacitaci 25 µF s napětím 2 500 V a o odporu 200 Ω. Po pulsu byly bakterie co nejrychleji smíchány s 1 ml 2xTY média ideálně o teplotě 37°C. Směs byla následně přenesena do 1,5 ml zkumavky a inkubována 1 hodinu při 37°C v třepačce pro mikrozkušavky TS-100 (BIOSAN Ltd.) při 700–800 otáčkách za minutu.

Transformované buňky byly následně vysety na plotny se selekčním antibiotikem o objemech: 10 μ l, 100 μ l a zbytek.

4.2.1.10.2 Transformace kvasinkových buněk za využití LiAc a teplotního šoku (rychlá metoda)

Čerstvě narostlé kvasinky (maximální stáří 4 dny) byly pomocí sterilního párátka přeneseny z kultivační plotny do 1 ml 100 mM LiAc a resuspendovány. Směs byla krátce stočena (7 sekund) a supernatant byl odstraněn. Na buňky bylo v následujícím pořadí napipetováno: 240 μ l 50% PEG, 36 μ l 1M LiAc, 50 μ l ssDNA (2 mg/ml) a 34 μ l vody s transformující DNA (0,1-10 μ g). Směs byla dokonale promíchána. Dále proběhla inkubace po dobu 30 minut v 28°C a následně po dobu 20 minut při 42°C. Buňky byly stočeny po dobu 2 minut při 1000 g a resuspendovány v 3 ml YPD média. Takto připravená transformovaná kultura byla kultivována minimálně 5 hodin při 28°C a následně vyseta na SD plotny s příslušným selekčním antibiotikem ve čtyřech ředěních: 1 μ l, 10 μ l, 100 μ l a zbytek.

4.2.1.10.3 Transformace kvasinkových buněk za využití LiAc a teplotního šoku (metoda s vyšším výtěžkem)

Požadovaná kvasinková kultura byla zaočkována do 5 ml YPD média s následnou aerobní inkubací přes noc při 28°C. V přes noc narostlé kultuře byla změřena hustota buněk (OD_{600}) a proběhlo přeočkování do 50 ml média YPD s finální koncentrací 5×10^6 buněk na ml, což odpovídá OD_{600} o hodnotě 0,3 (v případě *K. lactis*). Kultura byla inkubována při 28°C do finální koncentrace 2×10^7 buněk/ml ($OD_{600} = 0,9-1,1$). Inkubace trvala cca 5 hodin. Kultura byla centrifugována 5 minut při pokojové teplotě a 3 000 g. Vzniklý pelet byl resuspendován ve 25 ml ddH₂O a opět centrifugován při pokojové teplotě a 3 000 g. Vzniklý pelet byl resuspendován v 1 ml 100 mM LiAc. Suspenze byla stočena po dobu 30 sekund a 14 000 g a supernatant byl odstraněn. Buňky byly opět resuspendovány v 1 ml 100 mM LiAc a po 100 μ l přeneseny do mikrozku mávek na jednotlivé transformační reakce. Buňky byly krátce stočeny a supernatant byl odstraněn. Na buňky bylo v následujícím pořadí napipetováno: 240 μ l 50 % PEG, 36 μ l 1 M LiAc, 50 μ l ssDNA (2 mg/ml) a 34 μ l vody s transformující DNA (0,1-10 μ g). Směs byla intenzivně promíchána. Dále proběhla inkubace po dobu 30 minut při 28°C a po dobu 20 minut při 42°C. Následně

byl vzorek krátce stočen a supernatant odstraněn. K peletu byl přidán 1 ml média YPD a buňky byly resuspendovány. Následně byly buňky přeneseny do 4 ml YPD média a inkubovány 6 hodin při 28°C. Následně byly buňky vysety na plotny s vhodným selekčním antibiotikem v objemech 1 µl, 10 µl, 100 µl a zbytek.

4.2.1.11 Sekvenace

Vektory určené pro sekvenaci byly izolovány pomocí metody 4.2.1.1.3 nebo metody minipreparace z *E. coli* (4.2.1.1.1) nebo metodou izolace z gelu (4.2.1.1.7). Pro sekvenaci bylo použito cca 300 ng DNA a 0,5 µl 10 µM primeru. Směs byla doplněna ddH₂O do celkového objemu 7 µl. Takto připravený vzorek byl poslán na sekvenaci do Laboratoře sekvenace DNA PřF UK.

4.2.2 Manipulace s RNA

4.2.2.1 Izolace celkové RNA z kvasinek za použití TRI Reagent® Solution

Kvasinková kultura rostla přes noc v 50 ml YPD média se selekčním antibiotikem (G418 o koncentraci 500 µg/ml, HygB o koncentraci 200 µg/ml) při 28°C. Následně byla kultura přenesena do 50 ml zkumavky za přidání lžice ledu a centrifugována ve 4°C při 4 000 g po dobu 10 minut. Od této chvíle probíhal celý postup izolace na ledu. Supernatant byl odstraněn a buňky byly resuspendovány v 25 ml ddH₂O a opět stočeny ve 4°C při 4 000 g po dobu 10 minut. Po odstranění supernatantu byly buňky resuspendovány v 1 ml ddH₂O a suspenze byla přenesena do 1,5 ml zkumavky. Buňky byly centrifugovány při 4°C a 4000 g po dobu 1,5 minuty, supernatant byl následně odstraněn. Buňky byly lyzovány přidáním 1 ml Tri-Reagent (cca 100 µl buněk/1 ml Tri-Reagent) po dobu 3 minut, poté byla směs několikrát důkladně promíchána a následně inkubována po dobu 10 minut v 67°C. Lyzát byl schlazen na ledu po dobu 10 minut a doplněn o 150 µl 2M NaAc (pH=4,7) a o 350 µl chloroformu s 1% isoamylalkoholem. Směs byla důkladně promíchána a centrifugována 20 minut při 4°C a 13 000 g. Horní fáze vzniklá centrifugací byla přemístěna do nové 1,5 ml zkumavky. K odebrané fázi byl přidán 1x objem izopropanolu a proběhla inkubace po dobu 1 hodiny v -20°C. Dále proběhla centrifugace po dobu 20 minut, při 4°C a 13 000 g. Supernatant byl odstraněn a pelet byl promyt 1 ml 75% ethanolu. Opět proběhla

centrifugace po dobu 5 minut, při 4 °C a 13 000 g. Supernatant byl odstraněn a promývací krok byl zopakován. Po odstranění veškerého supernatantu se pelet nechal vyschnout při pokojové teplotě. Po vyschnutí byl pelet rozpuštěn ve 30 µl ddH₂O. Vzorek byl analyzován elektroforeticky.

4.2.2.2 Denaturační elektroforéza RNA (dle Mašek *et al*, 2005)

Agaróza byla připravena v koncentraci 1,5% v 1x pufru TAE zahřátím do úplného rozpuštění. Následně byla schlazena na cca 60 °C a nalita do předem sestavené vaničky s hřebenem, kde se nechala ztuhnout do podoby gelu. Hřeben byl odstraněn za vzniku separačních jamek, vanička s gelem byla přemístěna do elektroforetické nádoby a zalita 1x pufrem TAE. Analyzovaný vzorek izolované RNA byl připraven smícháním 5 µl RNA (koncentrace 5–15 µg), s 15 µl formamidu, 1 µl EtBr (výsledná koncentrace 0,1 µg/ml) a 2 µl 10x nanášecí barvy LD s BMF. Denaturace byla provedena zahřátím vzorku na 65 °C po dobu 10 minut a následným zchlazením. Vzorek byl nanesen do jamek gelu. Na vzorek se nechalo působit elektrické pole o konstantním napětí 6V/cm po dobu jedné hodiny. Po elektroforetické separaci byl gel analyzován pomocí transluminátoru generujícím UV záření s vlnovou délkou 254 nm a byla získána fotografie gelu pomocí přístroje Gel Logic 112 Imaging Systém (Kodak). Pro celkovou analýzu fotografie byl použit program Carestream (Kodak).

4.2.2.3 Degradace DNA za použití TURBO DNA-free kit od Ambionu

Pro DNAzování bylo použito 30 µl RNA (cca 20 µg), ke které bylo přidáno 13 µl ddH₂O, 5 µl 10x pufru pro DNazu I a 2 µl Turbo DNázy I. Směs byla promíchána, krátce stočena a inkubována 35 minut při 37 °C v termocykleru Mastercycler[®] ep Gradient S (Eppendorf). DNáza byla následně inaktivována přidáním 10 µl inaktivačního reagens, který byl součástí kitu DNA-free[™] Kit. Poté proběhla inkubace po dobu 5 minut při pokojové teplotě. Vzorek byl následně stočen po dobu 2 minut při 13 000 g a pokojové teplotě a horní čirá fáze byla přenesena do nové zkumavky. Centrifugace byla zopakována za účelem dokonalého odstranění inhibičního reagens ze vzorku. Vzorek bylo následně nutné skladovat v -80 °C.

4.2.2.4 Syntéza homopolymerního 3' konce RNA

K syntéze homopolymerního 3' konce bylo použito 1–10 µg RNA. Byla smíchána směs obsahující RNA o požadované koncentraci, 5 µl 5x pufru pro poly(A) polymerázu izolovanou z *E. coli* (E-PAP), 2,5 µl 25 mM MnCl₂, 2 µl E-PAP (2 U/ µl), 1,25 µl 40 mM CTP, 1 µl inhibitorů ribonukleáz a ddH₂O do celkového objemu 25 µl. Směs byla promíchána a krátce stočena po dobu 10 sekund při pokojové teplotě. Dále proběhla inkubace při 37°C po dobu 90 minut. Takto připravený vzorek je vhodný pro následnou reverzní transkripci.

4.2.2.5 Reverzní transkripce

Složení reakční směsi pro reverzní transkripci

Pro reverzní transkripci bylo použito 3-10 µg RNA, 3 µl hexanukleotidových náhodných primerů (150 ng/µl) nebo 1 µl oligo(dG)anch2 primeru (1 µg/µl), 2 µl 10 mM dNTP a ddH₂O do objemu 20 µl.

Takto připravená reakce byla promíchána a krátce stočena po dobu 10 sekund, při 14 000 g a teplotě 4°C. Následně proběhla inkubace v termobloku při 65°C po dobu 3 minut. Reakce byla schlazena na ledu a centrifugována za stejných podmínek jako v předchozím kroku.

Reakce byla následně doplněna o 4 µl 5x pufru pro reverzní transkriptázu SuperScript IVTM (SSCIV), 2 µl DTT (0,1 M) a 1 µl SSCIV.

Program pro reverzní transkripci

Připravená reakce byla promíchána a krátce stočena po dobu 10 sekund, při 14 000 g a 4 °C. Reakce byla dále inkubována v termocykleru Mastercycler[®] ep Gradient S (Eppendorf) s programem:

<u>Program s náhodnými primery</u>	
25 °C	10 minut
55 °C	99 minut
85 °C	15 minut
4 °C	Do odvolání

<u>Program s oligo(dG)anch2 primerem</u>	
55 °C	75 minut
70 °C	15 minut
4 °C	Do odvolání

Po reverzní transkripci byla komplementární DNA (cDNA) izolována metodou 4.2.1.1.6.

4.2.3 Manipulace s proteiny

4.2.3.1 Příprava kvasinkových lyzátů

Vhodně zaočkovaná kvasinková kultura byla kultivována přes noc v 50 ml média YPD se selekčním antibiotikem (YPD + G418 o koncentraci 500 µg/ml či YPD + HygB o koncentraci 200 µg/ml) při teplotě 28°C. Následně byla přenesena do 50 ml zkumavky a proběhla centrifugace po dobu 10 minut, 4 000 g a 4°C. Supernatant byl odstraněn a buňky byly resuspendovány v 700 µl lyzačního roztoku (100 mM K⁺-fosfátový pufr, pH 7,8). Suspenze byla přenesena do 1,5 ml zkumavky. Proběhla centrifugace po dobu 5 minut, při 8 000 g a 4°C. Supernatant byl odstraněn, k buňkám bylo přidáno 700 µl lyzačního roztoku a centrifugace byla zopakována jako v předchozím kroku. Po odstranění supernatantu bylo k buňkám přidáno 700 µl lyzačního roztoku s 1 mM PMSF. Suspenze byla dokonale promíchána a přenesena do nové 1,5 ml zkumavky s cca 400 µl skleněných kuliček o průměru 0,45 mm. Buňky byly homogenizovány v kulovém mlýnku Retsch® MM301 po dobu 3 minut při frekvenci 30 kmitů/sekundu. Lyzát byl od zbytků buněčných komponent a kuliček oddělen centrifugací trvající 5 minut, při 8 000 g a 4°C. Supernatant byl přenesen do nové 1,5 ml zkumavky a uchován při -80°C. Takto připravený lyzát je vhodný pro měření aktivity luciferáz.

4.2.3.2 Měření koncentrace proteinů

Koncentrace proteinů v kvasinkových lyzátech (4.2.3.1) byla měřena za použití ředící řady BSA (*Bovine Serum Albumin*), jež byla dostupná v laboratoři o koncentracích 100-2000 µg/ml. Lyzáty byly ředěny 100 mM K⁺-fosfátovým pufrem (pH=7,8) 10x, 20x a 50x. Do 96 jamkové destičky bylo vždy v triplicátech pro každý vzorek i standart napipetováno 200 µl reakčního roztoku a 25 µl vzorku. Měření proběhlo pomocí přístroje Clariostar o vlnové délce 562 nm.

4.2.3.3 Měření aktivity luciferáz

Kvasinkové lyzáty (4.2.3.1) byly v 96 jamkové destičce ředěny za pomoci 100 mM K⁺-fosfátového pufru (pH=7,8) 10x a 50x. Vzorky byly po ředění rozděleny do 3 jamek po 100 µl. Samotné měření fluorescence proběhlo pomocí přístroje Clariostar.

4.2.4 Manipulace s mikroorganismy

4.2.4.1 Kultivace bakterií

Kultivace bakterií probíhala na pevných agarózových půdách v termostatu či v tekutém médiu. Kultivace v tekutém médiu probíhala v Erlenmayerových baňkách v orbitální či reciproké třepačce. Bakterie byly kultivovány vždy při 37°C.

4.2.4.2 Kultivace kvasinek

Kultivace kvasinek probíhala na pevných agarózových půdách v termostatu či v tekutém médiu. Kultivace v tekutém médiu probíhala v Erlenmayerových baňkách v orbitální či reciproké třepačce. Kvasinky byly kultivovány vždy při 28°C.

4.2.4.3 Uchovávání bakteriálních a kvasinkových kmenů

Kvasinkové a bakteriální kmeny byly skladovány krátkodobě v řádu dnů až týdnů na agarózových půdách při 4°C či dlouhodobě v -80°C. Při dlouhodobém skladování byly mikroorganismy uchovány v 50% glycerolu v -8°C

4.2.4.4 Stanovení růstu mikroorganismů

Stanovení změny růstu bakterií a kvasinek probíhalo na základě měření změn optické hustoty (OD). Použito bylo záření o vlnové délce 600 nm. Měření probíhalo pomocí přístroje Spectronic® Helios Beta (Thermo Spectronic). Pokud bylo za potřeby, kultury byly před měřením ředěny 10x–20x.

4.2.4.5 Příprava elektrokompetentních buněk *E. coli*

Do 50 ml 2xTY média byla zaočkována bakteriální kultura *E. coli* XL-1 Blue. Kultura byla kultivována přes noc při 37°C. Po inkubaci bylo změřeno OD₆₀₀ narostlé kultury. Kultura byla přeočkována na OD₆₀₀ = 0,1 a nechala se růst cca 2-3 hodiny do OD₆₀₀ = 0,9. Narostlá kultura byla přenesena do 50 ml zkumavky. Proběhla centrifugace po dobu 10 minut při 2 800 g a 4°C. Supernatant byl odstraněn a buňky byly promyty ve 25 ml v na 4°C vychlazené ddH₂O. Suspenze byla centrifugována stejně jako v předchozím kroku. Supernatant byl odstraněn a pelet byl resuspendován ve 40 ml 10% vychlazeného glycerolu. Následně proběhla centrifugace po dobu 10 minut při 2 800 g a 4°C. Supernatant byl odstraněn a pelet byl resuspendován v 20 ml vychlazeného 10% glycerolu. Následně proběhla centrifugace jako v předchozích krocích. Supernatant byl odstraněn a buňky byly resuspendovány v 1-2 ml na 4°C vychlazeného 10% glycerolu. Do 1,5 ml zkumavek bylo rozpipetováno 300 µl připravené buněčné suspenze. Kompetentní buňky *E. coli* byly uchovány v -80°C. Takto připravené buňky jsou vhodné k transformaci DNA.

4.2.4.6 Stanovení auxotrofních vlastností kvasinkových kmenů

Kvasinkové kultury nesoucí příslušný vektor byly přečárkovány na agarózové plotny se selekčním antibiotikem (YPDA + HygB o koncentraci 200 µg/ml, YPDA + G418 o

koncentraci 500 µg/ml) a nechaly se růst po dobu 2-3 dní při 28°C. Pomocí sterilního párátka bylo cca 10 µl narostlé biomasy přeneseno do 200 µl ddH₂O. 5 µl ze směsi bylo nakapáno na jednotlivé agaróзовé plotny se selekčním médiem (SD+, SD-, -A, -H, -L, -K, -M, -T, -U, -W, YPDA, YPDA+G418 o koncentraci 500 µg/ml). Proběhla kultivace 2-3 dny při 28°C.

4.2.4.7 Pasážování kvasinkových buněk

Kvasinkové buňky byly přečárkovány na selekční plotny s antibiotiky (YPDA+G418 o koncentraci 500 µg/ml, YPDA+HygB o koncentraci 200 či 300 µg/ml). Po jejich nárustu (2-3 dny) byla část kultury o velikosti špendlíkové hlavičky sterilně přenesena do Erlenmeyerovy baňky s 5-10 ml tekutého média YPDA s příslušným antibiotikem (G418 o koncentraci 500 µg/ml, HygB o koncentraci 200 µg/ml). Buňky se nechaly růst přes noc v třepačce a při teplotě 28°C. Poté byl cca 1 µl kultury přenesen do nové baňky s tekutým YPDA médiem s vybraným selekčním antibiotikem, jak bylo popsáno výše. Buňky se nechaly opět růst přes noc při 28°C v třepačce. Tento krok se opakoval nejméně 4x. Po pasáži byly buňky vysety na YPDA misky s vhodným selekčním antibiotikem (YPDA+G418 o koncentraci 500 µg/ml, YPDA+HygB o koncentraci 200 či 300 µg/ml) v ředění 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} a 10^{-7} .

5 VÝSLEDKY

Prvním krokem byla konstrukce kvasinkového plasmidu se dvěma promotory, které budou mít pod kontrolou dva různé reportérové geny. Byl vybrán vektor pCEV-G1-Ph (Vickers *et al*, 2013) obsahující dva různé kvasinkové konstitutivní promotory, a tedy umožňující vytvoření dvou nezávislých expresních kazet. První expresní kazeta je poté pod kontrolou TEF1 promotoru pocházejícího z genu pro transkripční elongační faktor EF-1 α , součástí druhé kazety je PGK1 promotor pocházející z genu pro fosfoglycerát kinázu. Součástí plasmidu byly i geny pro rezistenci vůči antibiotikům, a to konkrétně ampicilinu a phleomycinu. Plasmid je možné exprimovat jak v bakteriálních buňkách *E. coli*, tak v kvasinkových buňkách *S. cerevisiae*, pro které je plasmid primárně konstruován (Vickers *et al*, 2013). Jako reportérové geny byly vybrány dvě různé luciferázy. Pod kontrolu TEF1 promotoru jsme se rozhodli vložit gen pro *Renilla* luciferázu a pod kontrolu promotoru PGK1 gen pro *firefly* luciferázu.

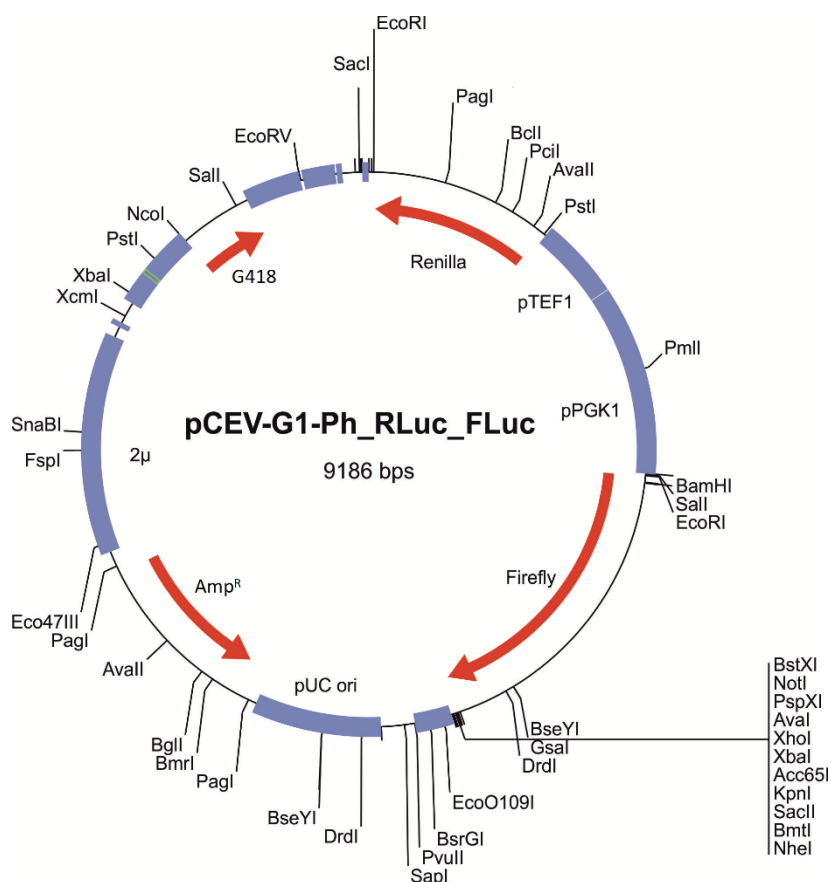
Druhým cílem této diplomové práce byla příprava reportérového systému rovnou v lineárních cytoplasmatických plasmidech pGKL kvasinky *K. lactis*. Většina transkriptů pGKL plasmidů se vyznačuje určitým počtem netemplátově přidaných adenosinových zbytků na svém 5' konci, což je pro eukaryotní transkripty zcela netypické. pGKL2 ovšem kóduje vlastní *capping* enzym a bylo zjištěno, že některé jeho transkripty, především genů *K2ORF2* a *K2ORF8* mají na svém 5' konci N⁷ methylguanozinovou čepičku (Vopálenský *et al*, 2019). V závislosti na těchto informacích vyvstala otázka, jakým způsobem probíhá iniciace translace plasmid specifických mRNA. Aby mohla tato otázka být zodpovězena, bylo třeba se inspirovat iniciací translace u jiných, pGKL plasmidům velmi podobných elementů, a sice transkriptů viru *Vaccinie*. Některé transkripty viru *Vaccinie* rovněž obsahují na 5' konci několik netemplátových adenosinových zbytků, nicméně transkripty viru *Vaccinie* jsou, na rozdíl od většiny transkriptů pocházejících z pGKL plasmidů, opatřeny čepičkou (více v kapitole 2.1.2.2). Pomocí celé řady experimentů bylo zjištěno, že iniciace translace mRNA pocházejících z viru *Vaccinie* je na čepičce nezávislá (Bablanian *et al*, 1991, Hasset *et al*, 1997, Mulder *et al*, 1998, Shirokikh a Spirin, 2008, Dhungel *et al*, 2017). Navíc transkripty obsahující na svém 5' konci 8-12 netemplátových adenosinů vykazovaly vyšší míru translace než transkripty s nižším počtem adenosinů (Gudkov *et al*, 2005). Pokud je počet adenosinů vyšší než 12, dochází pravděpodobně k vazbě faktorů inhibujících translaci (Xia *et al*, 2011). V závislosti na těchto studiích byla

ověřena podmíněnost translace pGKL plasmidů na translačních iniciačních faktorech vázajících čepičku, která se nepotvrdila (Vopálenský *et al*, 2019). Avšak roli v iniciaci / regulaci translace hraje protein PABP1 vázající sekvenci 12 a více adenosinů za současné inhibice translace (Vopálenský *et al*, 2019).

Jedním z cílů práce bylo studium vlivu počtu netemplátově přidaných adenosinových zbytků na 5' konci transkriptů lineárních plasmidů na translaci. Pro toto bylo potřeba vytvořit reportérové systémy přímo v lineárních plasmidech, kdy jeden z reportérových genů byl vložen pod promotor genu, jehož transkripty se vyznačují přítomností netemplátového 5' poly(A) konce. Jedná se o gen *K1ORF2*, který je součástí pGKL1 plasmidu. Tento otevřený čtecí rámec kóduje podjednotky toxinu α a β . Druhá reportérová kazeta byla situována do plasmidu pGKL2, konkrétně pod kontrolu promotoru K2ORF8. Funkce ORF8 je prozatím neznámá, avšak je transkribován za vzniku transkriptů obsahujících 5' *cap* strukturu (Vopálenský *et al*, 2019). Jako reportérový gen byl vybrán gen kódující *Renilla* luciferázu.

5.1 KONSTRUKCE BICISTRONÍHO KVASINKOVÉHO PLASMIDU

Vektor pCEV-G1-G418 bylo třeba upravit tak, aby obsahoval dva reportérové geny, konkrétně pro luciferázy. Geny pro luciferázy, sloužící jako reportéry, byly vyštěpeny z plasmidů připravených a dostupných v naší laboratoři. Gen pro *Renilla* luciferázu byl získán z plasmidu TOPO_RLuc_Paq_Xma_3-5 (Mašek, nepublikováno). *Ffirefly* byla získána z plasmidu pcDNA_FRT_EF1 α _R_L_A4K (Vopálenský, nepublikováno). Vektor pCEV-G1-Ph obsahoval gen kódující rezistenci vůči antibiotiku phleomycinu, kterou jsme se rozhodly změnit za gen kódující rezistenci proti antibiotiku G418 zejména z finančních důvodů. Plánované konstrukty byly nejprve připraveny *in silico* pomocí programu *Clone Manager Profesional v9.2* od *Sci-Ed Software*, za účelem vybrat nejlepší klonovací strategii. Mapu finálního plasmidu ukazuje **Obr. 9**.



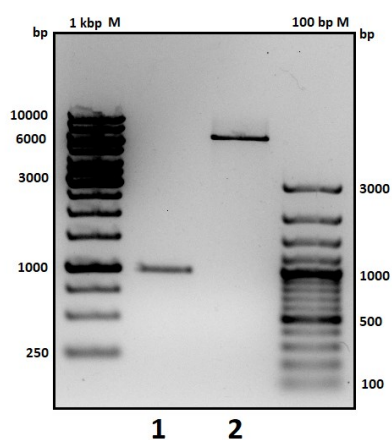
Obr. 9: Schéma duálního expresního plasmidu pro produkci dvou reportérových luciferáz, konkrétně pro expresi genů kódujících *Renilla* a firefly luciferázy v kvasinkových systémech. Geny kódující *Renilla* luciferázu, firefly luciferázu a gen kódující rezistenci k antibiotiku G418 byly štěpeny z donorových plasmidů restrikčními endonukleázami a následně ligovány do obdobně štěpeného vektoru pCEV-G1-Ph. Genová exprese reportérových luciferáz je řízena promotory TEF1 a PGK1. U vektoru je uvedena velikost v párech bází. Amp^R: rezistence vůči ampicilinu.

5.1.1 Příprava rekombinantního duálního plasmidu pCEV-G1-G418-RLuc

Jako první krok proběhlo štěpení plasmidu TOPO_RLuc_Paq_Xna_3-5 za účelem získání genu pro *Renilla* luciferázu. V souladu s předem naplánovaným štěpením byly zvoleny dvě restrikční endonukleázy, a sice EcoRV a SpeI. Nejdříve proběhlo štěpení vektoru za použití pomoci metody 4.2.1.4.1. Tímto štěpením došlo k linearizaci donorového plasmidu za vzniku dvou definovaných tupých konců. Směs byla následně elektroforeticky rozdělena v 0,5% agarózovém gelu (4.2.1.3), odkud byl následně plasmid izolován za použití metody 4.2.1.1.7. Gen kódující *Renilla* luciferázu byl poté z vektoru

vyštěpen za použití *SpeI* a za vzniku jasně definovaných konců. Plasmid byl od genu pro *Renilla* luciferázu oddělen pomocí elektroforetické separace (4.2.1.3) za použití 0,5% agarózového gelu. Proužek o odpovídající velikosti byl z gelu izolován metodou 4.2.1.1.7. Správnost a kvalita izolace byla rovněž ověřena elektroferoticky (4.2.1.3) v 0,8% agarózovém gelu (**Obr. 10**).

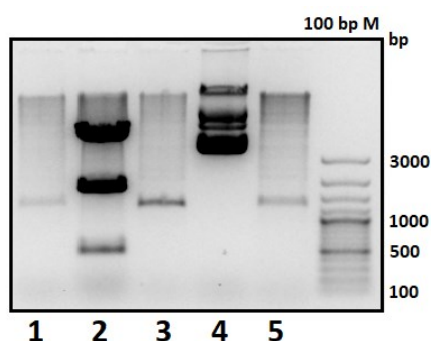
Podobným způsobem byl připraven plasmid pCEV-G1-Ph, kdy nejdříve došlo k jeho štěpení (4.2.1.4.1) za použití restriční endonukleázy *NotI*. Rovněž došlo ke vzniku dvou definovaných, avšak k ligaci nevhodných konců. Proto byly konce plasmidu zatupeny za použití Klenowova fragmentu DNA polymerázy I (4.2.1.4.3). Po zatupení došlo k přečištění (4.2.1.1.8) reakce. Linearizovaný plasmid byl následně štěpen restriční endonukleázou *SpeI*, kdy vznikly dva konce, jeden zatupený a druhý definovaný po štěpení příslušnou restriční endonukleázou. Takto připravené konce insertu a plasmidu byly vhodné k ligaci (4.2.1.6). Vektor byl před ligací také vyizolován z 0,5% agarózového gelu (4.2.1.1.7). Následně proběhlo ověření správné izolace za použití elektroforézy v 0,8% agarózovém gelu (4.2.1.3). Výsledné štěpené fragmenty, gen pro *Renilla* luciferázu a plasmid pCEV-G1-Ph ukazuje **Obr. 10**.



Obr. 10: Elektroforetogram plasmidu pCEV-G1-Ph a insertu (gen pro *Renilla* luciferázu), použitých při ligaci. (1) Fragment obsahující gen pro *Renilla* (1000 bp) získaný štěpením donorového plasmidu TOPO_RLuc_Paq_Xna_3-5 restričními endonukleázami *EcoRV* a *SpeI*. (2) Plasmid pCEV-G1-Ph štěpený *NotI*, po kterém došlo k zatupení konců a opětovnému štěpení *SpeI* (6500 bp). Jako hmotnostní markery byly použity GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder a GeneRuler™ 1 kbp DNA Ladder.

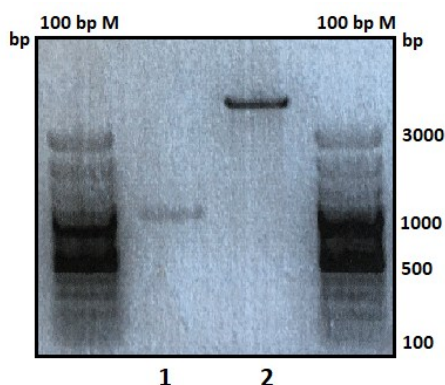
Inzert byl do plasmidu vložen za použití T4 DNA ligázy metodou 4.2.1.6. Ligační směs byla za použití elektroporace (4.2.1.10.1) transformována do bakterií *E. coli* XL-1

Blue. Bakterie byly vysety na misky se selekčním antibiotikem, na kterých však nebyly pozorovány žádné kolonie. V závislosti na zvýšení výtěžku elektroporace došlo k přečištění a zkoncentrování ligační směsi metodou 4.2.1.1.8. Elektroporace byla opakována tentokrát s pozitivním výsledkem. Narostlé kolonie byly přečárkovány na novou selekční plotnu. Z kolonií byla za použití minipreparace (4.2.1.1.1) izolována plasmidová DNA, která byla analyzována pomocí restričního štěpení endonukleázou PstI (4.2.1.4.2). Pokud byla ligace úspěšná, měly by vzniknout štěpením vektoru pCEV-G1-Ph-RLuc fragmenty o velikosti 470, 1759 a 5327 párů bází (**Obr. 11**).



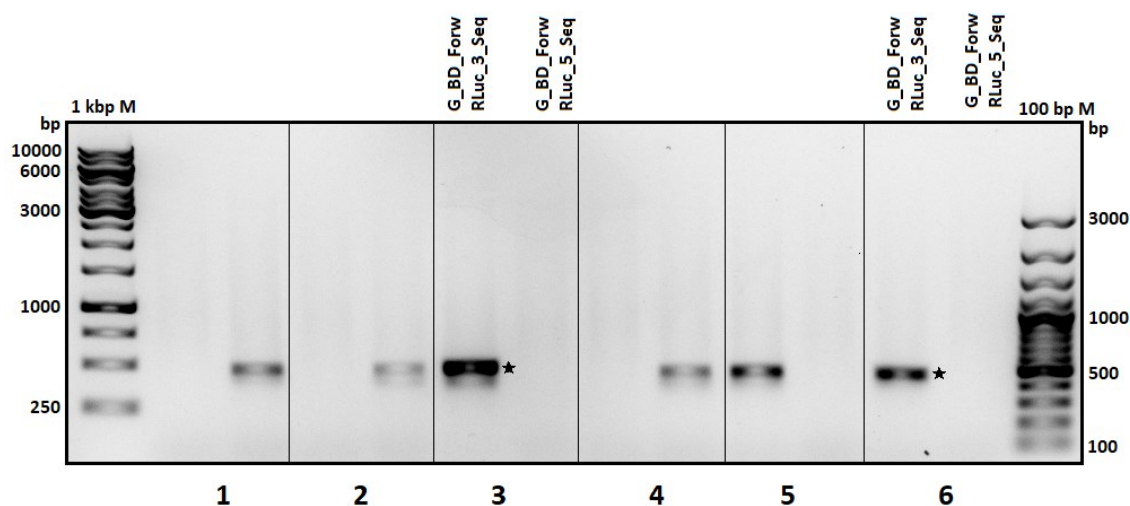
Obr. 11: Analytické štěpení plasmidu pCEV-G1-Ph-RLuc. Plasmid byl štěpen restriční endonukleázou PstI, za předpokládaného vzniku fragmentů o velikosti 470, 1759 a 5327 párů bází. Tyto podmínky splňoval pouze klon 2, z celkem 5 analyzovaných klonů. Jako hmotnostní marker byl použit GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder.

Pomocí restričního štěpení byl nalezen jeden pozitivní klon nesoucí gen pro *Renilla* luciferázu vloženou do vektoru pCEV-G1-Ph. Avšak analýza pomocí sekvenace odhalila, že je tento gen vložen v opačné orientaci. Následně byl gen pro *Renilla* luciferázu z plasmidu vyštěpen pomocí restriční endonukleázy EcoRI (4.2.1.4.1). Po štěpení od sebe byly fragmenty, tedy gen pro *Renilla* luciferázu a pCEV-G1-Ph, rozděleny elektroforeticky v 0,5% agarózovém gelu (4.2.1.3) a izolovány metodou 4.2.1.1.7. Analýza izolace byla ověřena pomocí agarózové elektroforézy v 0,8% gelu (4.2.1.3) **Obr. 12**.



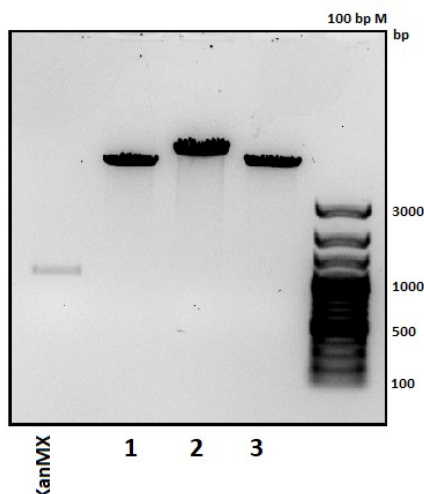
Obr. 12: Elektroforetogram plasmidu *pCEV-G1-Ph* (2) a genu pro *Renilla* luciferázu (1) po štěpení restriční endonukleázou *EcoRI*. Fragmenty byly štěpeny z plasmidu *pCEV-G1-Ph-RLuc*, kde byl gen pro *Renilla* luciferázu naklonován opačně. Jako hmotnostní marker byl použit *GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder*.

Konce štěpeného plasmidu byly následně defosforylovány (4.2.1.5) a gen pro *Renilla* luciferázu byl vložen do plasmidu opět za použití T4 DNA ligázy (4.2.1.6). Poté byla ligační směs elektroporací (4.2.1.10.1) transformována do *E. coli* XL-1 Blue. Pozitivní kolonie byly přečárkovány a pomocí minipreparace (4.2.1.1.1) z nich byla získána plasmidová DNA, která byla následně použita jako templát pro analytickou PCR s dvěma dvojicemi primerů G_BD_Forw / Rluc_5_Seq a G_BD_Forw / Rluc_3_Seq (4.2.1.9). Po proběhnutí PCR reakce se tato analyzovala na 0,8% gelu (4.2.1.3), kde byly následně pozorovány vzniklé amplikony (**Obr. 13**). Pokud u první dvojice primerů byl pozorován fragment o velikosti 481 bp, znamenalo to opačnou, a tedy pro nás nevhodnou, orientaci genu pro *Renilla* luciferázu. Pokud byl pozorován fragment u druhé dvojice primerů o velikosti 482 bp, znamenalo to přítomnost genu pro *Renilla* luciferázu o správné orientaci. Analyzovaných bylo celkem 24 klonů, z nichž byly vybrány dva pozitivní. Tyto klony byly následně izolovány z bakteriálních buněk minipreparací (4.2.1.1.1) i midipreparací (4.2.1.1.4) a poslány na sekvenaci (4.2.1.11) do Sekvenačního servisu PřF UK, který správnou orientaci genu pro *Renilla* luciferázu v plasmidu potvrdil.



Obr. 13: Elektroforetogram analytické PCR použité pro ověření přítomnosti a správné orientace genu pro *Renilla luciferázu* v plasmidu pCEV-G1-Ph. Pro každý vzorek byly použity dva páry primerů: *G_BD_Forw* / *RLuc_5_Seq* (předpokládaná velikost ampliconu 481 bp). Pokud byl pozorován tento produkt, jednalo se o špatně orientovaný gen pro *Renilla luciferázu*, jak je vidět například u vzorku 4. Druhá dvojice primerů: *G_BD_Forw* / *RLuc_3_Seq* (předpokládaná velikost ampliconu 482 bp). Přítomnost tohoto produktu označuje správně naklonovaný gen pro *Renilla luciferázu* v plasmidu pCEV-G1-Ph. Hvězdičky označují vybrané klony (3 a 6), použité pro další analýzy. Jako hmotnostní markery byly použity *GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder* a *GeneRuler™ 1 kbp DNA Ladder*.

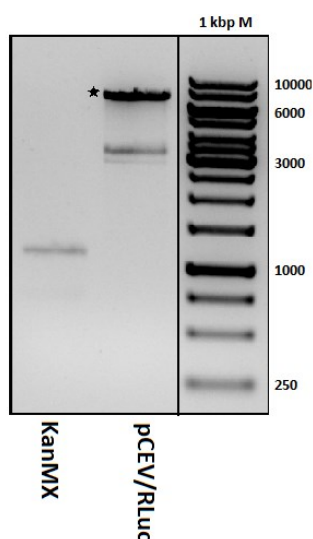
Dalším krokem byla výměna genu rezistence proti phleomycinu, který byl původní součástí plasmidu pCEV-G1-Ph za gen rezistence vůči G418. Původní plán spočíval ve štěpení plasmidu pCEV-G1-Ph-RLuc restričními endonukleázami *NcoI* a *EcoRV* (4.2.1.4.1). Po štěpení od sebe byly vzniklé fragmenty, plasmid a gen původní rezistence, odděleny elektroporací (4.2.1.3) v 0,5% gelu, odkud byl plasmid izolován (4.2.1.1.7). Jako donorový plasmid genu rezistence vůči G418 sloužil plasmid pUG6 (Güldener *et al*, 1996) který byl štěpen stejnými restričními endonukleázami (4.2.1.4.1). Separace genu rezistence o velikosti 1100 bp proběhla pomocí elektroforézy (4.2.1.3) v 0,5% gelu, odkud byl následně fragment izolován (4.2.1.1.7). Kvalita izolace byla v obou případech štěpení ověřena elektroforeticky v 0,8% agarózovém gelu (4.2.1.3) (**Obr. 14**).



Obr. 14: Elektroforetogram plasmidů (1) *pCEV-G1-Ph-FLuc*, (2) *pCEV-G1-Ph-RLuc* a (3) *pCEV-G1-Ph* štěpených restričními endonukleázami *NcoI* a *EcoRV*. *KanMX* představuje gen rezistence vůči G418 získaný z plasmidu *pUG6* restričním štěpením nukleázami *NcoI* a *EcoRV*. Jako hmotnostní marker byl použit *GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder*.

Následně byla provedena ligace za použití T4 DNA ligázy (4.2.1.6) fragmentu štěpeného plasmidu *pCEV-G1-Ph-RLuc*, teď již bez genu phleomycinové rezistence, s inzertem představujícím gen pro rezistenci vůči G418. Ligační reakce byla transformována elektroporací (4.2.1.10.1) do bakterií *E. coli* XL-1 Blue, které byly po kultivaci vysety na misky se selekčním antibiotikem. Vzniklé kolonie byly přečárkovány na nové selekční plotny a po izolaci DNA (4.2.1.1.1) testovány na přítomnost genu rezistence vůči G418. Testování proběhlo za použití restričního štěpení endonukleázami generujícími fragmenty o definované délce (4.2.1.4.2), avšak přes celou řadu testovaných klonů se nepodařilo najít žádný pozitivní. Rovněž bylo několikrát opakováno restriční štěpení plasmidů *pCEV-G1-Ph-RLuc* a *pUG6* (4.2.1.4.1) jako v prvním kroku a následná ligace (4.2.1.6), ale vždy s negativním výsledkem. Rovněž jsme vyzkoušeli štěpit ligační reakci restriční endonukleázou *Bsu36I* (*EcoR81I*) (4.2.1.4.1), která rozeznává a štěpí sekvenci v genu pro rezistenci vůči phleomycinu, čímž by se měly vyřadit plasmidy, kde neproběhla genová výměna. Avšak ani tato strategie nevedla k získání pozitivních klonů, proto jsme se rozhodli použít plasmid *pCEV-G1-G418-FLuc*, kam se nám již dříve podařilo gen pro rezistenci vůči G418 vložit (postup popsán v kapitole 5.1.3). Plasmid *pCEV-G1-Ph-RLuc* byl štěpen společně s plasmidem *pCEV-G1-G418-FLuc* restričními endonukleázami *NcoI* a *EcoRV* (4.2.1.4.1). Štěpené fragmenty od sebe byly odděleny

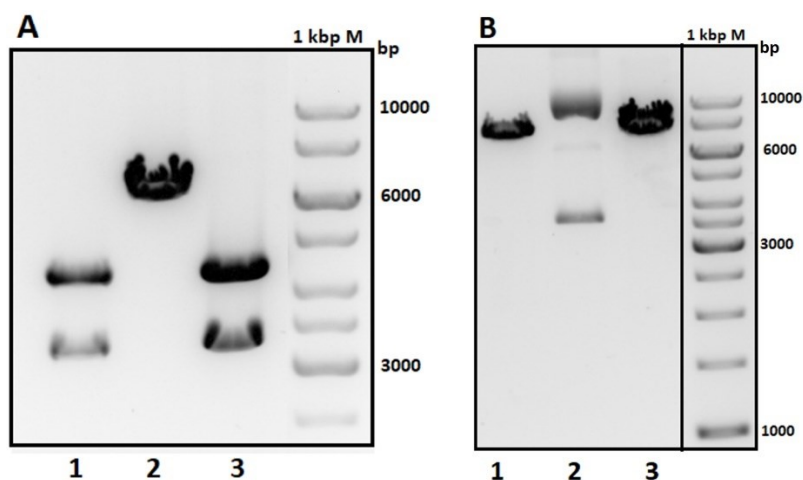
pomocí elektroforetické separace v 0,5% agarózovém gelu (4.2.1.3), odkud byly následně izolovány (4.2.1.1.7). Izolace fragmentů o správné velikosti byla ověřena v 0,8% agarózovém gelu pomocí elektroforézy (4.2.1.3) (**Obr. 15**).



Obr. 15: Elektroforetogram plasmidu *pCEV-G1-Ph-RLuc* (na obrázku zkratka *pCEV/RLuc*) po štěpení restričními endonukleázami *NcoI* a *EcoRV*. Černá hvězdička označuje proužek představující tento plasmid po štěpení o vhodné velikosti (6855 bp). Na obrázku se rovněž nachází gen pro rezistenci vůči G418 (*KanMX*) získaný restričním štěpením endonukleázami *NcoI* a *EcoRV* z plasmidu *pCEV-G1-G418-FLuc*. Jako hmotnostní marker byl použit *GeneRuler™ 1 kbp DNA Ladder*.

Získaný inzert byl vložen za použití T4 DNA ligázy do štěpeného vektoru *pCEV-G1-Ph-RLuc* (4.2.1.6). Po ligaci byla DNA transformována do bakteriálního kmene *E. coli* XL-1 Blue elektroporací (4.2.1.10.1). Bakterie byly následně vysety na misky se selekčním antibiotikem. Získané kolonie byly přechárkovány na nové selekční plotny a po izolaci DNA (4.2.1.1.1) testovány na přítomnost rekombinantního plasmidu *pCEV-G1-G418-RLuc*. Ověření klonů proběhlo pomocí restričního štěpení nukleázami *NcoI* a *HindIII* (4.2.1.4.2) a následné elektroforetické separace fragmentů v 0,8% agarózovém gelu (4.2.1.3) (**Obr. 16**). Pomocí tohoto analytického štěpení byly nalezeny dva klony obsahující plasmid *pCEV-G1-G418-RLuc* s vyměněným genem rezistence. Pro osekvenování (4.2.1.11) byl vybrán vektor izolován z klonu číslo 3 (4.2.1.1.1). Sekvence potvrdila pozitivní výsledek analytického štěpení, a to přítomnost genu rezistence vůči G418 v plasmidu. Plasmid byl poté izolován z bakteriálních buněk midipreparací (4.2.1.1.4) a byla změřena koncentrace plasmidové DNA (4.2.1.1.4). Plasmid byl transformován (4.2.1.10.2) do kvasinkového kmene *S. cerevisiae* pJ69α. Z kvasinek byl

vytvořen buněčný lyzát (4.2.3.1), kde byla změřena koncentrace proteinů (4.2.3.2) a následně luminiscence produktů reportérového genu (4.2.3.3).

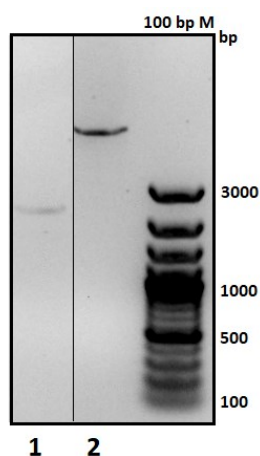


Obr. 16: Analytické štěpení rekombinantního plasmidu pCEV-G1-G418-RLuc. Je uveden výsledek štěpení DNA tří klonů. (A) Plasmid pCEV-G1-G418-RLuc po štěpení restriční endonukleázou HindIII. Pokud je přítomen gen pro rezistenci vůči G418, měl by být plasmid štěpen ve dvou místech za vzniku fragmentů o velikosti 4545 bp a 3224 bp, což můžeme pozorovat u vzorků číslo 1 a 2. (B) Plasmid pCEV-G1-G418-RLuc štěpen restriční endonukleázou NcoI. Pokud je přítomen gen pro rezistenci G418, měl by vzniknout fragment o velikosti 7969 bp, což je vidět u klonů číslo 1 a 3. Jako hmotnostní marker byl použit GeneRuler™ 1 kbp DNA Ladder.

5.1.2 Příprava rekombinantního plasmidu pCEV-G1-G418-RLuc-FLuc

Po úspěšné přípravě plasmidu pCEV-G1-Ph-RLuc bylo zapotřebí do tohoto plasmidu vložit druhý reportérový gen, konkrétně gen pro *firefly* luciferázu, který by byl pod kontrolou promotoru PGK1. Gen pro *firefly* luciferázu měl být původně získána z donorového plasmidu pcDNA_FRT_EF1 α _R_L_A4K po štěpení restričními endonukleázami XbaI a BamHI (4.2.1.4.1). Plasmid byl nejdříve štěpen gen XbaI (4.2.1.4.1), kdy následně došlo k zatupení konců štěpeného plasmidu (4.2.1.4.3). Současně byl také štěpen rovněž plasmid pCEV-G1-Ph-RLuc (4.2.1.4.1), kdy byla použita restriční endonukleáza HindIII s následným zatupením konců Klenowovým fragmentem DNA polymerázy I (4.2.1.4.3). Oba plasmidy byly poté štěpeny restriční endonukleázou BamHI (4.2.1.4.1) za vzniku fragmentů s definovanými konci vhodnými pro ligaci. Fragmenty měly být izolovány z 0,5% gelu (4.2.1.1.7), avšak ani po opakovaném štěpení nebyl gen

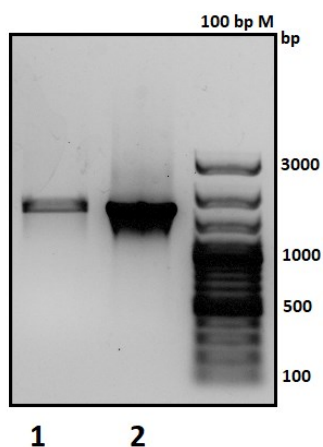
pro *firefly* luciferázu získán. Vzhledem k tomuto neúspěchu byla vybrána jiná restriční endonukleáza místo původně používaných endonukleáz XbaI resp. HindIII, a to konkrétně XhoI s tím, že následné štěpení společně se zatupením konců vektoru proběhlo stejně jako v předchozím postupu. Po úspěšném štěpení byly fragmenty izolovány z 0,5% gelu (4.2.1.1.7) a izolace byla analyzována pomocí elektroforézy v 0,8% agarózovém gelu (4.2.1.3) (**Obr. 17**).



Obr. 17: Fragmenty získané štěpením vektorů (1) *pcDNA_FRT_EF1α_R_L_A4K* restričními endonukleázami XhoI a BamHI za účelem získat gen pro *firefly* luciferázu a (2) *pCEV-G1-Ph-RLuc* štěpený HindIII a BamHI. Jako hmotnostní marker byl použit *GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder*.

Získaný fragment obsahující gen pro *firefly* luciferázu byl klonován do připraveného vektoru *pCEV-G1-Ph-RLuc* (4.2.1.6). Ligační reakce byla transformována (4.2.1.10.1) do buněk *E. coli* XL-1 Blue elektroporací. Avšak nebyly nalezeny žádné pozitivní kolonie, a to i přes opakovanou přípravu ligovaných fragmentů. Proto jsme se rozhodli pro přípravu fragmentu obsahujícího gen kódující *firefly* luciferázu použít PCR reakci s primery FLuc_HindIII / FLuc_BamHI komplementárními k okrajům genu pro *firefly* luciferázu a na svých 5' koncích nesoucí místa pro restriční endonukleázy BamHI a HindIII. Jako templát pro PCR reakci byl nejdříve vybrán plasmid *pcDNA5/FRT/EF1α/R_IRES_{opr}_L* (Vopálenský, nepublikováno). Z tohoto templátu se nepodařilo získat žádný fragment odpovídající velikosti, proto byl vybrán jiný plasmid *pcDNA5/FRT/TO_R_L* (Vopálenský, nepublikováno). Po proběhlé PCR reakci byl získán fragment odpovídající velikosti, což bylo ověřeno pomocí agarózové elektroforézy, kdy nejdříve proběhla izolace z 0,5% gelu (4.2.1.1.7) a následné ověření izolace v 1% agarózovém gelu (4.2.1.3) (**Obr. 18**). Získaný fragment byl současně štěpen restričními

endonukleázami HindIII a BamHI (4.2.1.4.1). Fragment byl po štěpení izolován z 0,5% agarózového gelu (4.2.1.1.7) a kvalita jeho izolace byla ověřena elektroforézou na 1% agarózovém gelu (4.2.1.3) (**Obr. 18**).

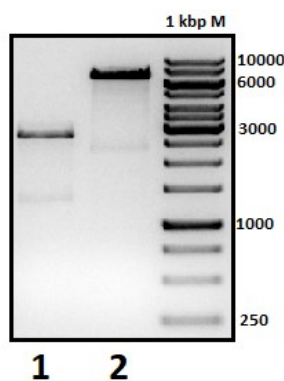


Obr. 18: (1) Fragment představující gen pro firefly luciferázu po štěpení restričními endonukleázami BamHI a HindIII po izolaci z 0,5% agarózového gelu. (2) Fragment představující gen pro firefly luciferázu po PCR reakci s primery FLuc_BamHI / FLuc_HindIII. Fragment by měl obsahovat restriční místa rozpoznávané restričními nukleázami BamHI a HindIII, kterými byl následně tento PCR produkt štěpen za vzniku fragmentu (1). Jako hmotnostní marker byl použit GeneRulerTM 100 bp Plus DNA Ladder.

Takto připravený fragment s genem pro firefly luciferázu a s definovanými konci po štěpení BamHI a HindIII je vhodný pro ligaci do vektoru pCEV-G1-Ph-RLuc, který byl naštěpen stejnými restričními endonukleázami, a tedy obsahuje stejné kohezní konce. Po použití T4 DNA ligázy (4.2.1.6) byla ligační směs transformována (4.2.1.10.1) do bakterií *E. coli* XL-1 Blue, které byly následně vysety na misky se selekčním antibiotikem. Kolonie byly přečárkovány na nové selekční plotny a analyzovány. Přes veškerou snahu se ovšem nepodařilo najít pozitivní klon. Proto byla opět změněna strategie klonování. Opět byl použit již hotový plasmid pCEV-G1-Ph-RLuc, který byl tentokrát naštěpen nově vybranými restričními endonukleázami BamHI a SalI (4.2.1.4.1). Štěpený plasmid byl izolován z 0,5% gelu (4.2.1.1.7), izolace byla ověřena pomocí agarózové elektroforézy v 0,8% gelu (4.2.1.3) (**Obr. 19**). Vektor byl dále opůsoben alkalickou fosfatázou (4.2.1.5), čímž byl připraven k ligaci (4.2.1.6). Jako inzert byl použit již dříve získaný fragment DNA nesoucí gen pro firefly luciferázu, který prošel již zmiňovaným restričním štěpením. Fragmenty byly ligovány (4.2.1.6) a následně transformovány (4.2.1.10.1) do bakterií *E. coli* XL-1 Blue. Bakterie byly vysety na selekční plotny a narostlé kolonie byly

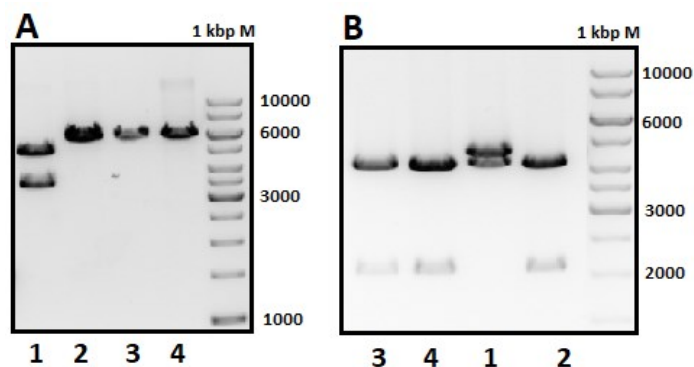
přečárkovány. Z kolonií byla izolována plasmidová DNA (4.2.1.1.3), jež byla poslána na sekvenaci (4.2.1.11), která potvrdila přítomnost genu pro *firefly* luciferázu v nově vytvořeném plasmidu pCEV-G1-Ph-RLuc-FLuc.

Pro naše účely bylo dále zapotřebí vytvořit plasmid obsahující gen rezistence vůči G418. Na základě toho byly plasmidy pCEV-G1-Ph-RLuc-FLuc a pCEV-G1-G418-FLuc štěpeny restričními endonukleázami EcoRV a BamHI (4.2.1.4.1). Po štěpení byly fragmenty o velikosti 2274 bází, pocházející z plasmidu pCEV-G1-Ph-RLuc-FLuc a 6777 bází z plasmidu pCEV-G1-G418-FLuc rozděleny elektroforeticky (4.2.1.3) v 0,5% agarózovém gelu, odkud proběhla izolace (4.2.1.1.7). Analýza izolace byla ověřena pomocí agarózové elektroforézy v 0,8% gelu (4.2.1.3) (**Obr. 19**).



Obr. 19: Fragmenty vzniklé štěpením vektorů (1) pCEV-G1-Ph-RLuc-FLuc (2274 bp) a (2) pCEV-G1-G418-FLuc (6777 bp) restričními endonukleázami EcoRV a BamHI. Jako hmotnostní marker byl použit GeneRulerTM 1 kbp DNA Ladder.

Izolované fragmenty byly inkubované za přítomnosti T4 DNA ligázy (4.2.1.6) a výsledná ligační reakce byla následně transformována (4.2.1.10.1) do bakterií *E. coli* XL-1 Blue. Po vysetí bakterií na selekční misky, přečárkování a izolaci DNA (4.2.1.1.1) proběhla analýza plasmidové DNA pomocí restričního štěpení restričními nukleázami HindIII a NcoI (4.2.1.4.2). Štěpené fragmenty byly následně rozděleny pomocí agarózové elektroforézy (4.2.1.3) v 0,8% gelu (**Obr. 20**).

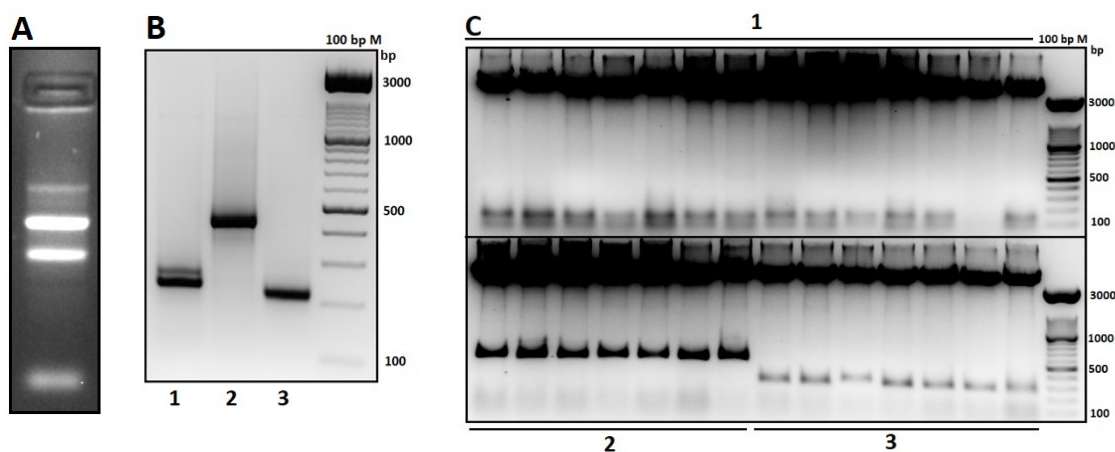


Obr. 20: Analytické štěpení rekombinantního plasmidu pCEV-G1-G418-RLuc-FLuc. Je uveden výsledek štěpení DNA čtyř klonů. (A) Plasmid pCEV-G1-G418-RLuc-FLuc po štěpení restriční endonukleázou NcoI. Pokud je přítomen gen pro rezistenci vůči G418, měl by být plasmid štěpen za vzniku fragmentů o velikosti 3896 bp a 5655 bp, což můžeme pozorovat u vzorku 1. (B) Plasmid pCEV-G1-G418-RLuc-FLuc štěpen restriční endonukleázou HindIII. Pokud je přítomen gen pro rezistenci vůči G418, měly by vzniknout fragmenty o velikosti 4545 a 5006 bp, což je vidět opět u klonu 1. Jako hmotnostní marker byl použit GeneRuler™ 1 kbp DNA Ladder.

Klon 1 byl následně osekvenován (4.2.1.11) a sekvenace potvrdila přítomnost genu pro rezistenci vůči G418 na předpokládaném místě. Plasmid byl poté izolován z bakteriálních buněk midipreparací (4.2.1.1.4) a byla změřena koncentrace plasmidové DNA (4.2.1.2). Plasmid byl následně transformován (4.2.1.10.3) do kvasinkového kmene *S. cerevisiae* pJ69α. Z kvasinek byl vytvořen buněčný lyzát, kde byla změřena koncentrace proteinů (4.2.3.2) a následně luminiscence produktů reportérových genů (4.2.3.3) (více v kapitole 5.3.1).

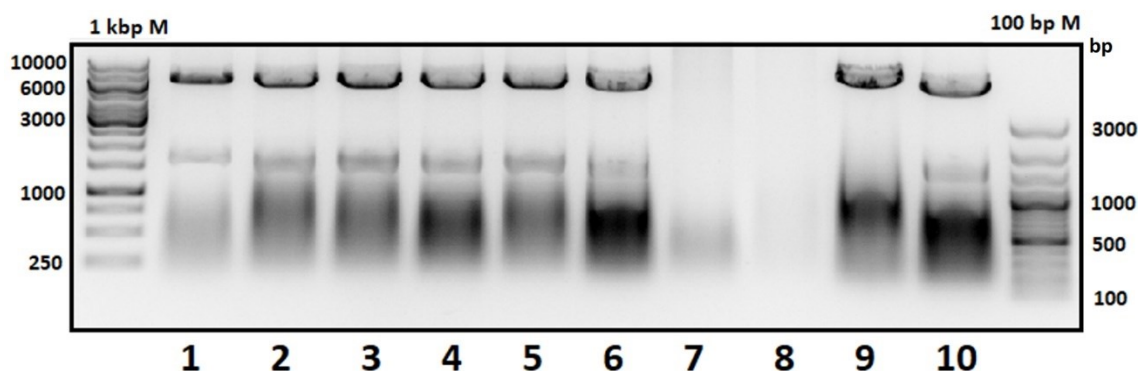
Z kvasinek obsahujících plasmid pCEV-G1-G418-RLuc-FLuc byla rovněž izolována RNA (4.2.2.1). Izolace byla ověřena pomocí agarózové elektroforézy v 1,5% gelu (4.2.2.2) (**Obr. 21**). Následně byla RNA zbavena kontaminující DNA (4.2.2.3) a pomocí reverzní transkripce převedena na cDNA (4.2.2.5). Po inkubaci cDNA s TdT (4.2.1.8) byla provedena 5' RACE PCR s primery Oligo(2dC)anchor a třemi variantami primerů: RLuc_5_Seq (5' RACE PCR transkriptu genu pro *Renilla* luciferázu), FL2rev4 a Fluc_Seq_rev (v obou případech 5' RACE PCR transkriptu genu pro *firefly* luciferázu) (4.2.1.9). Výsledek 5' RACE PCR byl analyzován pomocí agarózové elektroforézy v 1% gelu (4.2.1.3) (**Obr. 21**), odkud byly následně získané fragmenty izolovány (4.2.1.1.7) a vloženy do vektoru pCR™ 4-TOPO® (4.2.1.7). Ligační reakce byla transformována (4.2.1.10.1) do bakterií *E. coli* XL-1 Blue, ze kterých byla po nárustu kolonií izolována

plasmidová DNA (4.2.1.1.1). DNA byla štěpena (4.2.1.4.2) restriční endonukleázou EcoRI, za účelem ověření přítomnosti produktu 5' RACE PCR (**Obr. 21**). Vektory obsahující hledaný inzert byly sekvenovány pomocí T7 promotor primeru (4.2.1.11). Výsledky sekvenace jsou zobrazeny pomocí **Obr. 22**.



Obr. 21: (A) RNA izolovaná z kvasinkových buněk nesoucích duální plasmid pCEV-G1-G418-RLuc-FLuc. (B) 5'RACE PCR cDNA získané z RNA plasmidu pCEV-G1-G418-RLuc-FLuc. (1) 5'RACE PCR provedena s primery Oligo(2dC)anchor / Fluc_Seq_rev. Délka fragmentu by měla být 157 bází, což je na gelu pozorovatelné. Jedná se o segment DNA představující 5' konec transkriptu pocházejícího z genu pro firefly luciferázu. (2) 5'RACE PCR provedena s primery Oligo(2dC)anchor / FL2rev4. Délka amplifikovaného segmentu by měla být 363 bp, což také odpovídá. Segment mapuje 5' konec transkriptu pocházejícího z genu pro firefly luciferázu. (3) 5'RACE PCR provedena s primery Oligo(2dC)anchor / RLuc_5_Seq. Výsledkem by měl být segment o velikosti 131 bp, což opět odpovídá. Jedná se o segment mapující 5' konec transkriptu genu pro Renilla luciferázu. (C) Analytické restriční štěpení endonukleázou EcoRI plasmidu pCRTM4-TOPO[®] za cílem ověřit přítomnost analyzovaných fragmentů získaných 5'RACE PCR z transkriptů reportérových genů pro Renilla a firefly luciferázy. (1) Velikost fragmentu odpovídající štěpenému produktu 5'RACE PCR genu pro Renilla luciferázu je 200 bp. (2) Velikost fragmentu odpovídající štěpenému produktu 5'RACE PCR (při které byl použit primer FL2rev4) genu pro firefly luciferázu je 600 bp. (3) Velikost fragmentu odpovídající štěpenému produktu 5'RACE PCR (při které byl použit primer FLuc_Seq_Re) genu pro firefly luciferázu je více než 400 bp. Jako hmotnostní marker byl použit GeneRulerTM 100 bp Plus DNA Ladder.

DNA ligázou (4.2.1.6), ligační směs poté byla transformována elektroporací (4.2.1.10.1) do bakterií *E. coli* XL-1 Blue. Po transformaci byly bakterie vysety na selekční plotny. Narostlé kolonie byly přečárkovány a následně po izolaci DNA (4.2.1.1.1) došlo k analýze pomocí restrikčního štěpení (4.2.1.4.2). Pro analytické restrikční štěpení byly vybrány restrikční endonukleázy BamHI a HindIII, kdy došlo k opětovnému vyštěpení genu pro *firefly* luciferázu a měl tím pádem vzniknout fragment o velikosti 1600 bází. Po štěpení byly fragmenty analyzovány pomocí agarózové elektroforézy v 0,8% gelu (4.2.1.3) (**Obr. 23**).

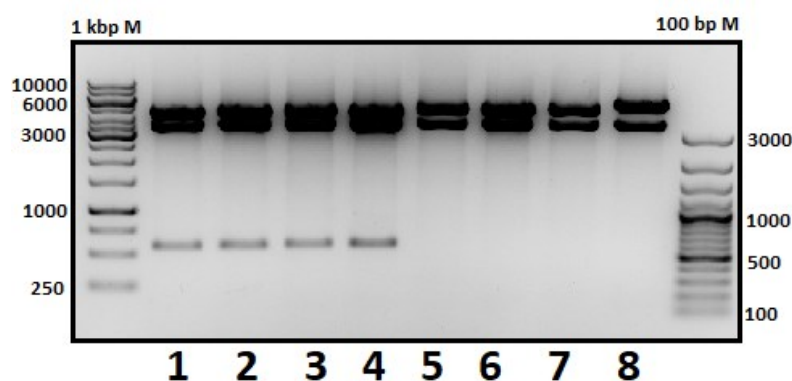


Obr. 23: Analytické štěpení vektoru pCEV-G1-Ph-FLuc izolovaného z 10 klonů. Štěpení proběhlo za použití restrikčních endonukleáz BamHI a HindIII. U klonů 1–6 a 10 je možné vidět vyštěpený gen pro luciferázu *firefly* o velikosti 1600 bází, což představuje pozitivní výsledek. Těžší fragment představuje zbytek štěpeného vektoru. Jako hmotnostní markery byly použity GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder a GeneRuler™ 1 kbp DNA Ladder.

Klony vykazující pozitivní výsledek po analytickém štěpení byly sekvenovány (4.2.1.11), kdy se potvrdila přítomnost genu pro *firefly* luciferázu v plasmidu pCEV-G1-Ph-FLuc.

Dalším krokem byla výměna genu rezistence oproti phleomycinu za gen rezistence vůči G418. Plasmid pCEV-G1-Ph-FLuc byl štěpen restrikčními endonukleázami NcoI a EcoRV (4.2.1.4.1). Donorovým plasmidem pro gen rezistence vůči G418 byl opět plasmid pUG6, který byl štěpen stejným způsobem. Fragmenty byly odděleny pomocí agarózové elektroforézy (4.2.1.3) v 0,5% agarózovém gelu a následně izolovány (4.2.1.1.7). Izolace byla ověřena elektroforézou v 0,8% agarózovém gelu (4.2.1.3) (**Obr. 14**). Po izolaci proběhla inkubace insertu a plasmidu s T4 DNA ligázou (4.2.1.6), kdy následně došlo k transformaci ligační směsí elektroporací (4.2.1.10.1) do bakterií *E. coli* XL-1 Blue. Bakterie byly vysety na selekční plotny. Výsledné kolonie byly přečárkovány, jejich

plasmidová DNA izolována metodou 4.2.1.1.1 a testována na přítomnost rekombinantního plasmidu pCEV-G1-G418-FLuc, která se v tomto kroku nepotvrdila. Proto bylo restriční štěpení opakováno a následná ligační směs byla před transformací přečištěna (4.2.1.1.8). Ani po tomto kroku nebyly ovšem nalezeny pozitivní kolonie, proto jsme se rozhodli najít nové restriční endonukleázy, konkrétně BstEII a EcoRV. Plamidy pCEV-G1-Ph-FLuc a pUG6 byly štěpeny těmito restričními endonuklázy (4.2.1.4.1) za vzniku definovaných fragmentů. Následné postupy, izolace fragmentů, ligace, transformace a izolace DNA proběhly stejným způsobem, jako bylo popsáno výše. Plasmidová DNA byla analyzována pomocí restričního štěpení (4.2.1.4.2) nukleázami HindIII a EcoRV. Celkem měly vzniknout 3 fragmenty (o velikosti 4545, 3442 a 573 bp) potvrzující pozitivní výsledek. Štěpení bylo analyzováno pomocí agarózové elektroforézy v 0,8% gelu (4.2.1.3) (**Obr. 24**).

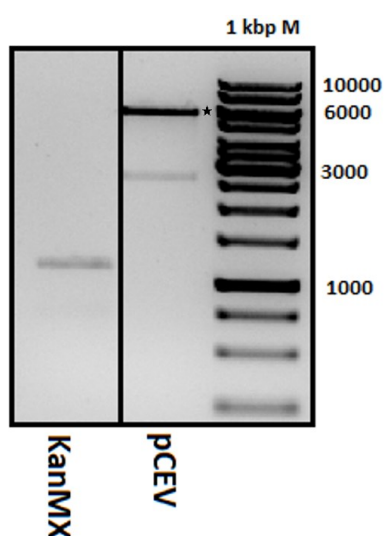


Obr. 24: Elektroforetogram analytického štěpení plasmidu pCEV-G1-G418-FLuc restričními nukleázami HindIII a EcoRV. Pozitivní výsledek představují fragmenty o velikosti 4545, 3442 a 573 bází, což vykazují klony 1-4. Jako hmotnostní markery byly použity GeneRulerTM 100 bp Plus DNA Ladder a GeneRulerTM 1 kbp DNA Ladder.

Plasmidová DNA klonu 1 byla následně odeslána na sekvenaci (4.2.1.11), která potvrdila přítomnost genu rezistence oproti G418 v plasmidu pCEV-G1-G418-FLuc. Plasmid byl transformován (4.2.1.10.2) do kvasinkového kmene *S. cerevisiae* pJ69α. Následně byl z kvasinek obsahujících tento plasmid vytvořen buněčný lyzát (4.2.3.1) a byla změřena luminiscence (4.2.3.3) (více v kapitole 5.3.1).

5.1.4 Příprava rekombinantního plasmidu pCEV-G1-G418

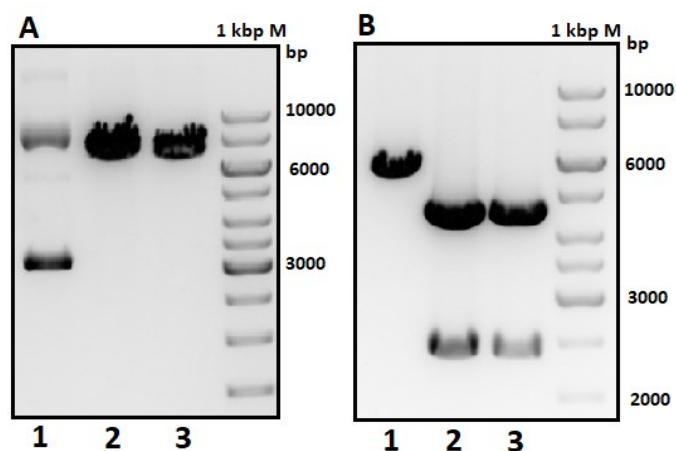
Podobným způsobem, jakým byla připraveny plasmidy v předchozích kapitolách (5.1.2, 5.1.3), jsme se rozhodli vytvořit plasmid pCEV-G1-G418 z původního pCEV-G1-Ph, tedy plasmid bez reportérových genů, ale s genem rezistence vůči G418. Při jeho přípravě byl použit plasmid pCEV-G1-Ph a pCEV-G1-G418-FLuc. Oba plasmidy byly štěpeny za použití restrikčních endonukleáz (4.2.1.4.1) NcoI a EcoRV za vzniku potřebných fragmentů o délce u pCEV-G1-Ph 5863 bází a u pCEV-G1-G418-FLuc 1118 bází. Výsledek štěpení ukazuje **Obr. 25**, kde jsou fragmenty po izolaci z 0,5% agarózového gelu (4.2.1.1.7) a po elektroforetické separaci v 0,8% agarózovém gelu (4.2.1.3).



Obr. 25: Fragmenty vzniklé štěpením vektorů pCEV-G1-Ph (pCEV, 5863 bp, černá hvězdička) a pCEV-G1-G418-FLuc (KanMX, 1118 bp) restrikčními endonukleázami EcoRV a NcoI. Jako hmotnostní marker byl použit GeneRuler™ 1 kbp DNA Ladder.

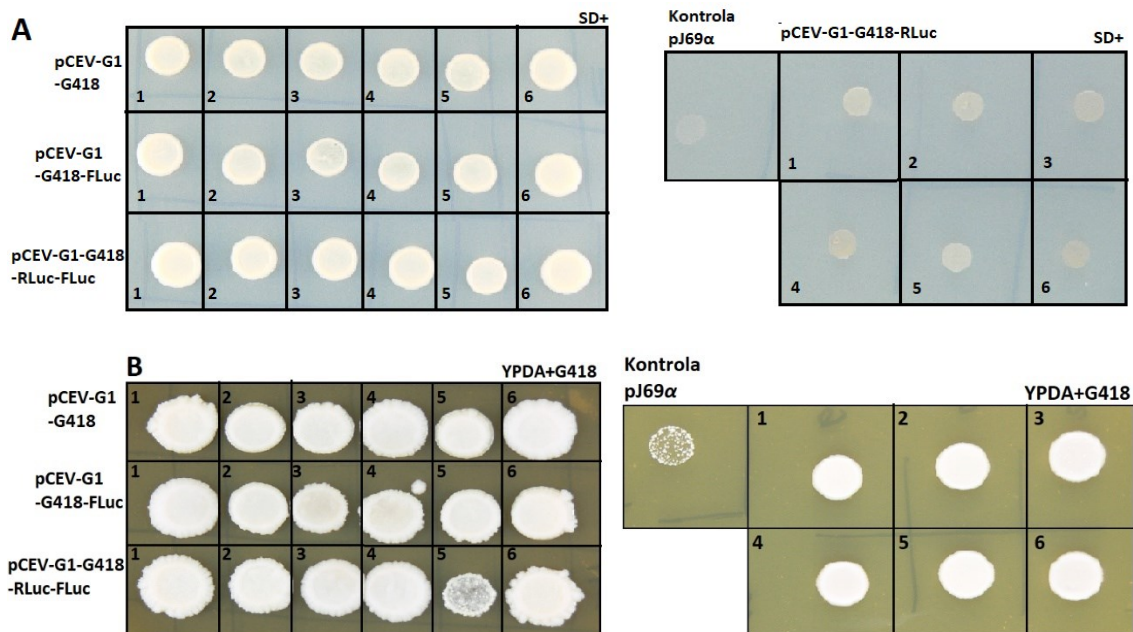
Následně byly fragmenty inkubovány s T4 DNA ligázou (4.2.1.6) a ligační reakce byla transformována (4.2.1.10.1) do bakterií *E. coli* XL-1 Blue. Po vysetí na misky se selekčním antibiotikem a přečárkování vzniklých kolonií byla izolována plasmidová DNA (4.2.1.1.1). DNA byla analyzována štěpením restrikčními endonukleázami (4.2.1.4.2) HindIII a NcoI. Po štěpení byly fragmenty rozděleny pomocí agarózové elektroforézy v 0,8% gelu (4.2.1.3) (**Obr. 26**). Po ověření přítomnosti pozitivních klonů se nechal klon 2 sekvenovat (4.2.1.11). Plasmid byl transformován (4.2.1.10.2) do kvasinkového kmene *S. cerevisiae* pJ69a. Následně byl z kvasinek obsahujících tento plasmid vytvořen buněčný

lyzát (4.2.3.1) a byla změřena, jak koncentrace proteinů (4.2.3.2), tak luminiscence (4.2.3.3) (více v kapitole 5.3.1).



Obr. 26: Analytické štěpení rekombinantního plasmidu *pCEV-G1-G418*. Je uveden výsledek štěpení DNA tří klonů. (A) Plasmid *pCEV-G1-G418* po štěpení restriční endonukleázou *NcoI*. Pokud je přítomen gen pro rezistenci vůči G418, měl by být plasmid štěpen za vzniku fragmentu o velikosti 6981 bp, což můžeme pozorovat u vzorků 2 a 3. (B) Plasmid *pCEV-G1-G418* štěpen restriční endonukleázou *HindIII*. Pokud je přítomen gen pro rezistenci vůči G418, měly by vzniknout fragmenty o velikosti 4545 a 20436 bp, což je vidět opět u klonů 2 a 3. Jako hmotnostní marker byl použit *GeneRuler™ 1 kbp DNA Ladder*.

U kvasinek nesoucích nově vytvořené reportérové plasmidy s rezistencí vůči antibiotiku G418 byl proveden test auxotrofie. Kvasinky byly na test auxotrofie připraveny metodou 4.2.4.6 a následně proběhlo jejich rozkapání na výše uvedené agarózové plotny (4.2.4.6). Jako příklad uvádím fotku plotny SD a plotnu YPDA s antibiotikem G418 (o koncentraci 500 µg/ml) (**Obr. 27**).

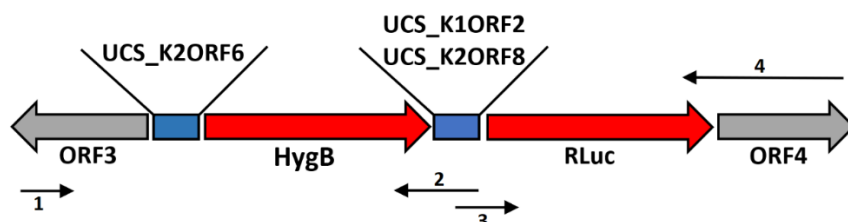


Obr. 27: Test auxotrofie. (A) Vždy šest individuálních kvasinkových klonů *S. cerevisiae* pJ69α nesoucích příslušné plasmidy, bylo rozkapáno na agarovou plotnu SD+ v 6 opakováních. (B) Rozkapání na selekční plotnu YPDA s antibiotikem G418 (o koncentraci 500 µg/ml) v 6 opakováních.

5.2 KONSTRUKCE REPORTÉRŮ PŘÍMO V LINEÁRNÍCH PLASMIDECH

5.2.1 Gen pro *Renilla* luciferázu pod kontrolou promotoru *K1ORF2*

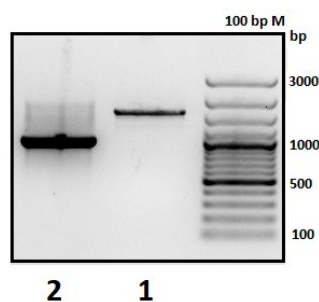
První kazeta je situována do plasmidu pGKL1. V ideálním případě dojde k vložení reportérové kazety a nezbytného selekčního markeru, genu kódujícího rezistenci vůči antibiotiku hygromycin, mezi dva otevřené čtecí rámce bez jejich porušení, čímž zůstane jejich funkčnost zachována. Na obou koncích kazety jsou sekvence komplementárními k sekvencím plasmidu pGKL1 (část *ORF3* a *ORF4*), do nich se má tato kazeta vložit. Strukturu kazety ukazuje Obr. 28.



Obr. 28: Struktura reportérových kazet vložených do plasmidu pGKL1. Červené šipky označují gen pro rezistenci vůči hygromycinu (*HygB*) a gen pro *Renilla* luciferázu (*RLuc*). Šedé šipky označují otevřené čtecí rámce plasmidu pGKL1 představující vhodné sekvence pro homologní rekombinaci (*ORF3* a *ORF4*). Modré obdélníky značí promotory, které kontrolují genovou expresi reportérového genu *RLuc* (*UCS_K1ORF2*, *UCS_K2ORF8*) a genu pro hygromycinovou rezistenci (*UCS_K2ORF6*). Kazetu určenou pro vznik transkriptů s netemplátovou polyadenylací na svém 5' konci představuje promotorová sekvence *UCS_K1ORF2*. Kazetu určenou pro vznik transkriptů s čepičkou na 5' konci představuje promotor *UCS_K2ORF8*. Černé šipky představují primery použité při tvorbě kazet. První PCR reakce použitá k vytvoření první poloviny kazet proběhla za použití primerů (1) *5_RACE_03_K1_2* a (2) *K1_UCS2_RLuc_R1* v případě první kazety nebo *K1_UCS8_RLuc_R1* v případě druhé kazety. Druhá PCR použitá k vytvoření druhé poloviny kazet proběhla za použití primerů (3) *K1_UCS2_RLuc_F2* v případě první kazety nebo v případě druhé kazety *K1_UCS8_RLuc_F2* a (4) *K1_UCSx_RLuc_R2* v obou případech. Fúzní PCR proběhla u obou kazet za použití dvou vytvořených fragmentů z předešlých PCR reakcí a primerů (1) a (4). Fúzní PCR vznikly dvě kazety, kdy první s promotorem *UCS_K1ORF2* měla délku 2630 bp a druhá kazeta s promotorem *UCS_K2ORF8* měla délku 2622 bp.

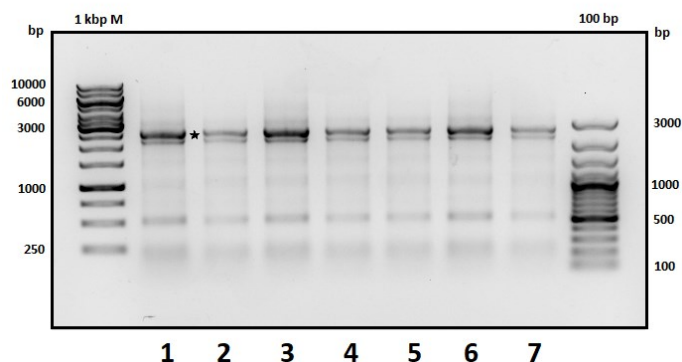
Tvorba reportérové kazety byla rozdělena do tří částí. Nejdříve bylo potřeba získat gen kódující rezistenci k hygromyciu. K tomu byl použit kmen *K. lactis* IFO1267 pRKL1-9, obsahující modifikovaný plasmid pGKL1 s genem kódujícím rezistenci k hygromycinu (Sýkora, 2018). Z tohoto kmene byla izolována DNA minipreparací (4.2.1.1.5), která byla následně použita jako templát pro PCR reakci s primery 5_RACE_03_K1_2 / K1_UCS2_RLuc_R1 (4.2.1.9). Amplikon o předpokládané délce 1618 bp nesoucí gen pro hygromycinovou rezistenci byl izolován z 0,5% agarózového gelu (4.2.1.1.7). Správnost izolace byla ověřena elektroforeticky v 0,8% agarózovém gelu (4.2.1.3) (**Obr. 29**). Takto připravená DNA byla vhodná pro použití na fúzní PCR (4.2.1.9.1).

Templátová DNA pro přípravu druhé části kazety, konkrétně část obsahující gen pro *Renilla* luciferázu, měla být získána z donorového plasmidu pcDNA5/FRT/EF1 α /R_IRES_{opr}_L. Plasmid byl nejprve izolován z kvasinek metodou 4.2.1.1.5. Jako templát pro PCR byl použit 200x zředěný izolovaný plasmid. Gen kódující *Renilla* luciferázu měl být z plasmidu amplifikován pomocí primerů K1_UCS2_RLuc_F2 / K1_UCSx_RLuc_R2, avšak ani jeden z několika provedených pokusů nebyl úspěšný. Proto byl jako donorový plasmid zvolen pcDNA5/FRT/TO_R_L. Tento plasmid byl rovněž nejdříve izolován z bakteriálních buněk (4.2.1.1.1) a 200x zředěn. Následně proběhla PCR (4.2.1.9) s již dříve uvedenými primery, která byla tentokrát úspěšná. Amplikon o vyhovující délce 1042 bp byl izolován z 0,5% agarózového gelu (4.2.1.1.7) a uschován pro další práci (**Obr. 29**).



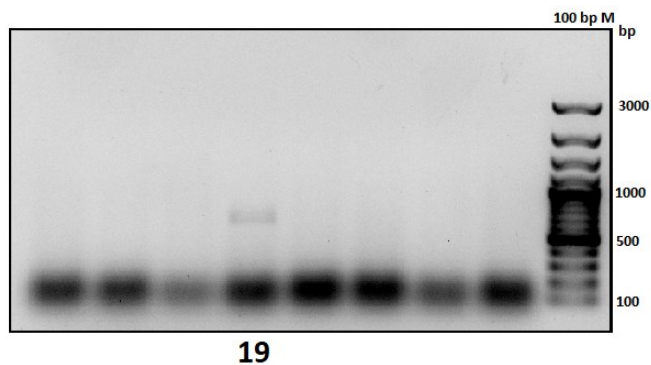
Obr. 30: Elektroforetogram konstruktů nesoucích (1) gen kódující hygromycinovou rezistenci a (2) gen kódující *Renilla* luciferázu. Konstrukty byly získány metodou PCR z donorových plasmidů. Výsledné amplikony o velikosti (1) 1 618 bp a (2) 1 042 bp byly izolovány z 0,5% gelu a analyzovány pomocí elektroforézy v 0,8% gelu. Jako hmotnostní marker byl použit GeneRulerTM 100 bp Plus DNA Ladder.

Takto připravené fragmenty byly vhodné pro vytvoření výsledné kazety. Fúzní PCR proběhla metodou (4.2.1.9.1), za přítomnosti získaných konstruktů s genem pro hygromycinovou rezistenci, genem pro *Renilla* luciferázou a primerů 5_RACE_03_K1_2 / K1_UCSx_RLuc_R2. Fúzní PCR byla několikrát opakována za účelem vytvoření co největšího množství kazet vhodných k homologní rekombinaci v kmeni *K. lactis* IFO1267 a *S. cerevisiae* YAT. Konstrukty byly izolovány z 0,5% gelu (4.2.1.1.7) a izolace byla ověřena pomocí elektroforézy v 0,8% gelu (4.2.1.3) (**Obr. 30**).



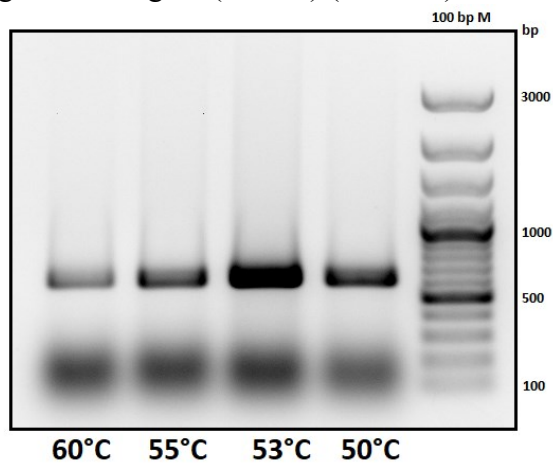
Obr. 30: Reportérové kazety vytvořené fúzní PCR. PCR byla provedena v sedmi opakováních (označení jednotlivých opakování číslicemi 1–7). Hvězdička označuje produkt o předpokládané velikosti (2600 bp) představující hotovou reportérovou kazetu. Jako hmotnostní markery byly použity GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder a GeneRuler™ 1 kbp DNA Ladder.

Získané kazety byly vhodné pro transformaci do kvasinkových buněk. Kazety byly transformovány (4.2.1.10.3) do kvasinkového kmene *K. lactis* IFO1267 a současně do kmene *S. cerevisiae* YAT, který rovněž nese pGKL plasmidy. Pokud byla transformace úspěšná, byly na selekčních miskách narostlé kolonie, které byly přečárkovány na nové misky se selekčním médiem za účelem získání dostatku biomasy pro následné analýzy. Z jednotlivých klonů byla izolována DNA (4.2.1.1.5) sloužící jako templát pro analytickou PCR (4.2.1.9). Ověřovací PCR proběhla s primery RLuc_3_Seq / 5_RACE_04_K1. Analýza PCR proběhla pomocí elektroforézy v 0,8% agarózovém gelu (4.2.1.9) (**Obr. 31**).



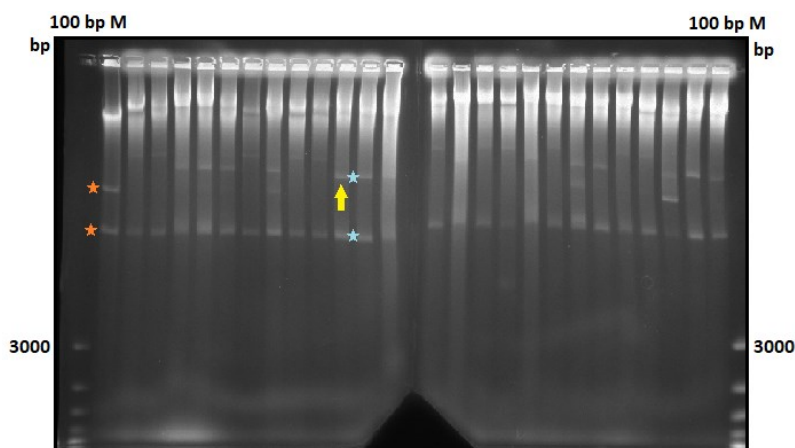
Obr. 31: Elektrofortofram analytické PCR klonů nesoucích reportér pod kontrolou promotoru *KIORF2* v 0,8% gelu. PCR proběhla za přítomnosti primerů *RLuc_3_Seq* / *5'RACE_04_K1* za vzniku fragmentu o velikosti 602 bp. Toto splňoval jen jeden z ověřovaných klonů, konkrétně klon 19. Jako hmotnostní marker byl použit *GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder*.

Z analyzovaných klonů byl vybrán klon 19 pocházející z *K. lactis* IFO1267, který jako jediný vykazoval pozitivní výsledky. Pro zlepšení výsledků analytické PCR byla provedena gradientová PCR (4.2.1.9) s klonem 19 a rozdílnými teplotami nasedání primerů *RLuc_3_Seq* / *5_RACE_04_K1*. Původní teplota byla 55°C. Jako gradientové teploty byly stanoveny teploty: 50°C, 53°C, 55°C a 60°C. Výsledek PCR byl pozorován na 1% agarózovém gelu (4.2.1.3) (**Obr. 32**).



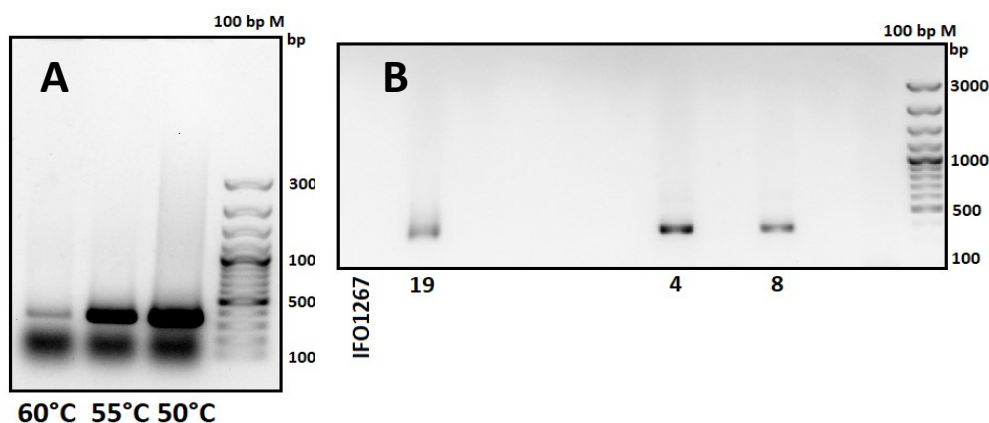
Obr. 32: Elektroforetogram gradientové analytické PCR s pozitivním klonem 19 v 1% agarózovém gelu. PCR byla provedena za účelem optimalizace teploty nasedání primerů *RLuc_3_Seq* / *5_RACE_04_K1*. Jako nejlepší teplota byla stanovena teplota 53°C. Jako hmotnostní marker byl použit *GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder*.

Klon 19 byl celkem 4x pasážován (4.2.4.7) za účelem vyřazení nerekombinovaných pGKL plasmidů. Po pasáži byly buňky vysety na misky se selekčním antibiotikem v ředěních 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} a 10^{-7} . Kolonie byly přečárkovány na nové selekční misky a následně byly použity pro tvorbu PCR templátů (4.2.1.1.5) a pro izolaci DNA (4.2.1.1.2) na elektroforetickou separaci v 0,5% agarózovém gelu (4.2.1.3) (**Obr. 33**).



Obr. 33: Elektroforeograf klonů získaných pasážováním klonu 19, kde byl předpoklad výskytu reportérové kazety s genem pro *Renilla luciferázu*. Červené hvězdičky označují plasmidy izolované z kmene *K. lactis* IFO1267, do kterých nebyla vložena kazeta (kontrola). Modré hvězdičky označují oba pGKL plasmidy vybraných klonů. Žlutá šipka označuje plasmid, kde došlo k vložení reportérové kazety. Kazeta byla původně určena pro vložení do plasmidu pGKL1 pod kontrolu promotoru K1ORF2. Podle elektroforézy je ovšem posunut větší plasmid pGKL2, což znamená, že k vložení došlo právě do tohoto plasmidu. Jako hmotnostní marker byl použit GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder.

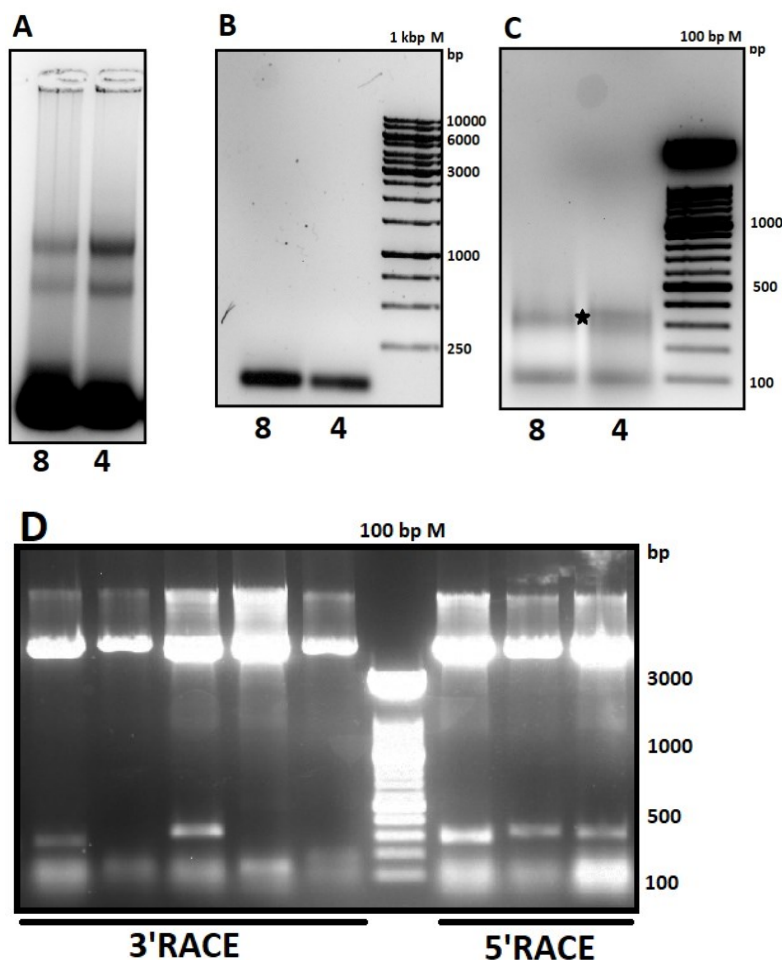
Analytická PCR (4.2.1.9) byla rovněž provedena s primery RLuc_5_Seq / Hygro_tail, které umožnily detekci přítomnosti 5' konce genu kódujícího *Renilla luciferázu* v plasmidu pGKL1. Pokud byla kazeta přítomná, vznikl band o velikosti 367 bp. Byla testována celá řada klonů, avšak u žádného nebyl pozorován pozitivní výsledek, opět kromě klonu 19, se kterým byla nejdříve provedená gradientová PCR (4.2.1.9) (viz **Obr. 34**). Následné analýzy dalších klonů potvrdily přítomnost dalších dvou pozitivních klonů, klonu 4 a klonu 8 (**Obr. 34**). Transformace (4.2.1.10.3) v kmeni *S. cerevisiae* YAT, nesoucím pGKL plasmidy, nebyla úspěšná, nepodařilo se najít žádný pozitivní klon.



Obr. 34: (A) Elektroforetogram analytické PCR klonu 19 provedená v teplotním gradientu 50°C, 55°C a 60°C. PCR proběhla s primery *RLuc_5_Seq* / *Hygro_tail*, které generují proužek DNA o velikosti 367 bp. Jako nejlepší teplota nasedání primerů byla zvolena teplota 50°C. (B) Elektroforetogram klonů 19, který byl použit jako pozitivní kontrola, 4 a 8, které vykazovaly pozitivní výsledek. Jako negativní kontrola byl použit kmen *K. lactis* IFO1267. Jako hmotnostní marker byl použit v obou případech *GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder*.

Klony 4 a 8 byly následně osekvenovány (4.2.1.11). Avšak sekvenace ukázala, že část kazety, konkrétně část genu pro *Renilla* luciferázu se nepodařilo vložit a při genové expresi by tedy neměl vznikat celý produkt. I přes to jsme se rozhodli tyto klony uchovat při -80°C a následně jsme rovněž změřili aktivitu luciferázy u klonu 4 (4.2.3.3). Rovněž byla z obou klonů izolována celková RNA (4.2.2.1). Izolace byla ověřena pomocí agarózové elektroforézy (4.2.2.2) v 1,5% gelu a spektrofotometricky ověřena (4.2.1.2) (**Obr. 35**). Následně došlo k odstranění kontaminující DNA (4.2.2.3) a bylo možné provést reverzní transkripci (4.2.2.5). Reakční směs byla po reverzní transkripci přečištěna pomocí komerčního kitu (4.2.1.1.6). Opůsobením TdT (4.2.1.8) byl vytvořen 3' nástavec cDNA pro 5'RACE PCR (5.2.1.9). 5'RACE PCR proběhla s primery *RLuc_5_Seq* / *Oligo(2dC)anchor*. Provedena byla rovněž 3'RACE PCR (4.2.2.4, 4.2.1.9) za použití primerů *RLuc_3_Seq* / *Oligo(dG)anchor2*. Obě PCR reakce byly analyzovány pomocí elektroforetické separace v 0,8% gelu (4.2.1.3) (**Obr. 35**), odkud byly následně izolovány (4.2.1.1.7). K další analýze byl vybrán pouze klon 4. Izolované fragmenty byly klonovány do plasmidu *pCR™4-TOPO®* (4.2.1.7). Ligační reakce byla následně transformována (4.2.1.10.1) do bakterií *E. coli* XL-1 Blue a bakterie byly vysety na misky s X-Gal. Bílé

nebo jemně modré kolonie byly přečárkovány, dále z nich byla izolována DNA (4.2.1.1.1) a analyzována pomocí restriční štěpení (4.2.1.4.2) restriční endonukleázou EcoRI.

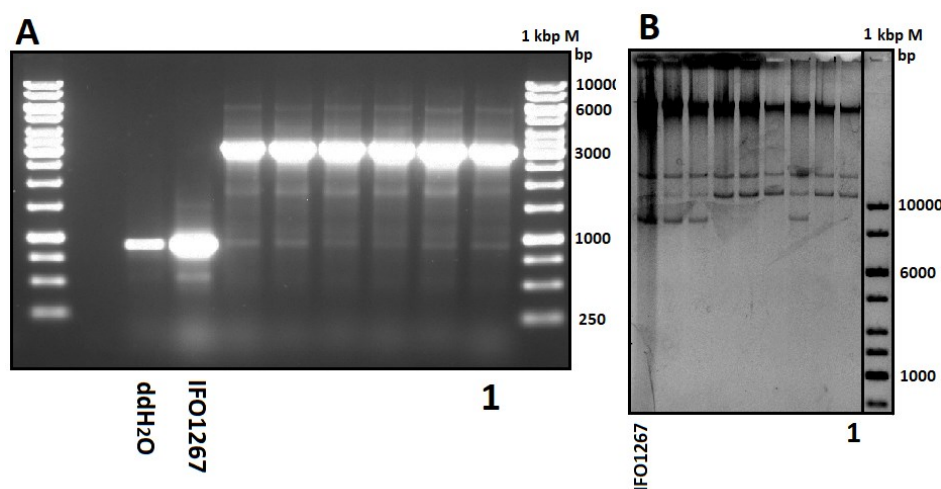


Obr. 35: (A) Izolovaná celková RNA z klonů 8 a 4, které obsahovaly část reportérové kazety určené pod kontrolu promotoru *K1ORF2*. (B) Výsledná 5'RACE PCR klonů 8 a 4 obsahující 5' konec cDNA předpokládaného transkriptu genu pro Renillu. (C) Výsledná 3'RACE PCR klonů 8 a 4 obsahující 3' konec cDNA předpokládaného transkriptu genu pro Renilla luciferázu. Černá hvězdička označuje proužek o předpokládané velikosti. (D) Analytické restriční štěpení endonukleázou EcoRI plasmidu pCRTM4-TOPO[®] za cílem ověřit přítomnost analyzovaných fragmentů 5'RACE PCR (měl vzniknout fragment o velikosti 300 bp) a 3'RACE PCR (měl vzniknout fragment o velikosti 350 bp) transkriptů reportérového genu klonu 4. Součástí obrázku je výřez gelu, kde jsou kolny splňující tyto podmínky i klony negativní. Jako hmotnostní markery byly použity GeneRulerTM 100 bp Plus DNA Ladder a GeneRulerTM 1 kbp DNA Ladder.

Byly vytvořeny rekombinantní plasmidy, kdy v jednom případě byla kazeta chybně umístěna do plasmidu pGKL2 místo do cílového plasmidu pGKL1. V druhém případě se

pravděpodobně podařilo do plasmidu pGKL1 vložit jen část kazety. Proto bylo stále zapotřebí vytvořit rekombinantní plasmid pGKL1 s celou reportérovou kazetou. Opět proběhla slučovací PCR (4.2.1.9.1), jak bylo popsáno výše, kdy byly následně vytvořené kazety transformovány (4.2.1.10.3) do kmenů *K. lactis* IFO1267 a *S. crevisiae* YAT. Transformované kvasinky byly vysety na misky se selekčním antibiotikem a narostlé kolonie byly testovány na přítomnost reportérové kazety v pGKL1. Bohužel se zatím nepodařilo získat reportérovou kazetu pod kontrolou promotoru *KIORF2* v pGKL1 plasmidu, která by se nacházela v kvasinkovém kmeni *S. cerevisiae* YAT.

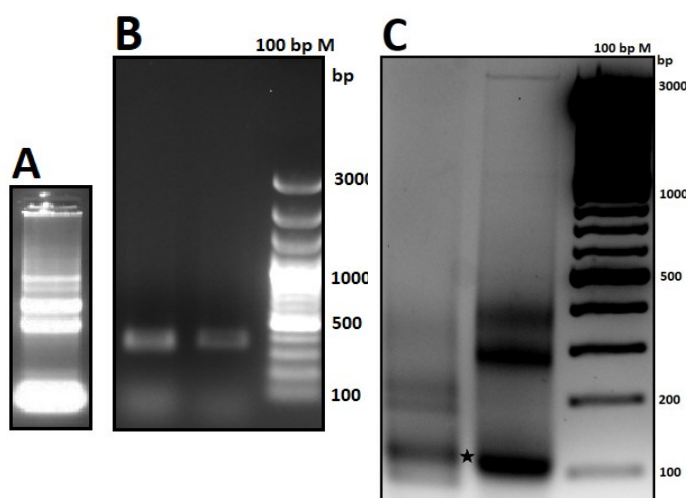
Kolonie získané transformací kvasinkových buněk *K. lactis* IFO1267 byly analyzovány pomocí PCR (4.2.1.9) s primery 5_RACE_03_K1_2 / 5_RACE_04_K1. Přítomnost kazety je potvrzena pomocí fragmentu DNA o délce 3026 bp. PCR reakce byly analyzovány pomocí agaróзовé elektroforézy v 0,8% gelu (4.2.1.3) (**Obr. 36**). Z pozitivních kolonií byl vybrán klon 1, jenž byl 4x pasážován (4.2.4.7). Kvasinkové buňky byly po pasáži vysety na misky s hygromycinem (o koncentraci 300 µg/ml). Získané kolonie byly přechárkovány a následně z nich byla izolována plasmidová DNA (4.2.1.1.2), která byla analyzována pomocí elektroforézy (**Obr. 36**). Byl vybrán jeden pozitivní klon, který byl osekvenován (4.2.1.11), což potvrdilo přítomnost celé reportérové kazety v pGKL1 plasmidu pod kontrolou promotoru *KIORF2*.



Obr. 36: (A) Analytická PCR za přítomnosti primerů 5_RACE_03_K1_2 / 5_RACE_04_K1 ověřující přítomnost reportérové kazety v pGKL1 plasmidu u klonů *K. lactis* IFO1267. Při analytické PCR měl vzniknout fragment o velikosti 3026 bází, což bylo pozorováno u všech testovaných klonů. Jako kontrola byla použita DNA získaná z kmene *K. lactis* IFO1267, do kterého nebyla vložena kazeta a samotná ddH₂O bez DNA. Pro další analýzy byl vybrán klon 1. (B) Dlouhá elektroforéza klonů získaných pasážováním klonu 1. Byl zde opět vybrán klon 1, jenž vykazoval pGKL1 plasmid, který měl větší velikost, tudíž zde byl pravděpodobný výskyt reportérové kazety. Jako hmotnostní markery byl použit GeneRuler™ 1 kbp DNA Ladder.

Z klonu 1, kde byla potvrzena přítomnost reportérové kazety nesoucí gen pro *Renilla* luciferázu pod kontrolou promotoru *KIORF2*, byla dále izolována celková RNA (4.2.2.1), která byla následně zbavena zbytkové DNA pomocí deoxyribonukleázy I (4.2.2.3). Pro analýzu 5' konců transkriptů reportérového genu byla izolovaná RNA pomocí reverzní transkripce (4.2.2.5) převedena na cDNA, která byla přečištěna (4.2.1.1.6) a opůsobena TdT (4.2.2.4), kvůli syntéze homopolymerního 3' konce obsahujícího guanosiny. Následně byla provedena 5'RACE PCR (4.2.1.9) s primery Oligo(d2C)anchor / RLuc_5_Seq. Produkty PCR byly rozděleny elektroforeticky (4.2.1.3) v 1% agarózovém gelu a následně klonovány (4.2.1.7) do vektoru pCR™ 4-TOPO®. Plasmid s inzertem byl transformován do bakterií *E. coli* XL-1 Blue. Bakterie byly vysety na selekční plotny a následně z nich byla izolována plasmidová DNA. Přítomnost produktu 5'RACE PCR jako součásti vektoru pCR™ 4-TOPO® byla ověřena restričním štěpením endonukleázou EcoRI (**Obr. 37**). Klony obsahující potřebný inzert byly osekvenovány (4.2.1.11) za použití T7 promotor primeru. Výsledek sekvenovaných 5' transkriptů ukazuje **Obr. 38**. Většina ze

sekvenovaných transkriptů genu pro *Renilla* luciferázu pod kontrolou promotoru *K1ORF2*, jehož součástí je INR element, byla netemplátově polyadenylována na svém 5' konci. Ale u některých mRNA byla rovněž detekována 5' čepička.



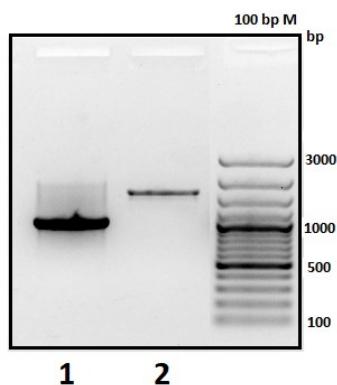
Obr. 37: (A) RNA izolovaná z kvasinek nesoucích modifikovaný plasmid *pGKL1* s reportérovým genem pod kontrolou promotoru *K1ORF2*. (B) Výsledná 5'RACE PCR transkriptů genu *Renilla* luciferázy. (C) Analytické štěpení vektoru *pCRTM 4-TOPO[®]* obsahujícího produkt 5' RACE PCR genu pro *Renilla* luciferázu. Vektor byl štěpen enzymem *EcoRI* za vzniku produktu o velikosti 150 bp (označeno černou hvězdičkou). Jako hmotnostní markery byl použit *GeneRulerTM 1 kbp DNA Ladder*.

Obr. 38: 5'RACE analýza transkriptů reportérového genu pod kontrolou promotoru *K1ORF2*. Horní sekvence odpovídá plasmidové sekvenci promotoru (UCS a INR elementy jsou vyznačeny). Níže jsou sekvence získané sekvenací cDNA klonů reportérového genu, konkrétně jejich 5' konce. U transkriptů je možné pozorovat netemplátově přidané adenosinové zbytky až po translační start kodón ATG. U některých transkriptů byl rovněž detekován výskyt *N*⁷methylguanosinové čepičky. Guanosiny představující čepičku jsou označeny černou barvou.

5.2.2 Gen pro *Renilla* luciferázu pod kontrolou promotoru *K2ORF8*

82

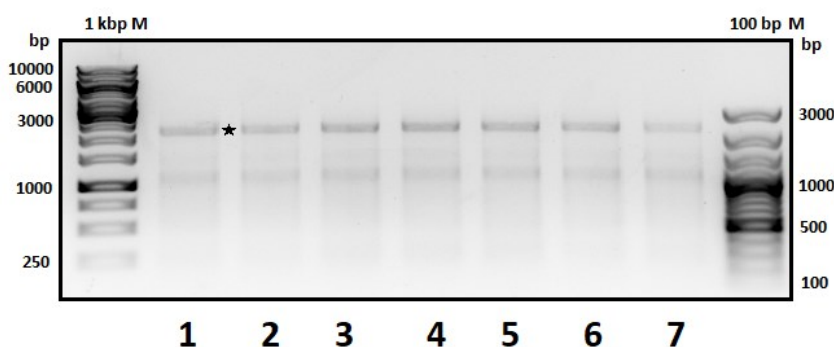
Kazeta byla podobně jako v předchozím případě připravená pomocí tří PCR reakcí. Nejdříve byl použit kvasinkový kmen *K. lactis* IFO1267 nesoucí plasmid pRKL1-9 (viz výše) pro izolaci DNA (4.2.1.1.5), z něhož byl získán gen pro hygromycinovou rezistenci pomocí PCR reakce (4.2.1.9) s primery 5'RACE_03_K1_2 / K1_UCS8_RLuc_R1. Po reakci proběhlo elektroforetické rozdělení PCR směsi v 0,5% agarózovém gelu (4.2.1.3). Fragment o správné velikosti 1000 bp byl následně z gelu izolován (4.2.1.1.7) a izolace byla ověřena elektroforeticky v 0,8% gelu (4.2.1.3) (**Obr. 39**). Druhá PCR (4.2.1.9) s primery K1_UCS8_RLuc_F2 / K1_UCSx_RLuc_R2 sloužila pro získání genu kódující *Renilla* luciferázu. Podobně jako při tvorbě první reportérové kazety, i zde byl nejdříve použit jako templát plasmid pcDNA5/FRT/EF1 α /R_IRES_{opr}_L, ze kterého se ovšem nepodařilo reportérový gen získat. Proto byl použit jako templát plasmid pcDNA5/FRT/TO_R_L. PCR směs byla po reakci analyzována pomocí 0,5% agarózového gelu (4.2.1.3), ze kterého byla následně izolována DNA o odpovídající velikosti 1600 bp (4.2.1.1.7). Izolace byla ověřena pomocí agarózové elektroforézy v 0,8% gelu (4.2.1.3) (**Obr. 39**).



Obr. 39: Elektroforetogram sekvencí DNA sloužících k vytvoření reportérové kazety. (1) DNA (velikost 1000 bp) získaná PCR reakcí s primery 5'RACE_03_K1_2 / K1_UCS8_RLuc_R1 za účelem získání segmentu obsahujícího gen pro hygromycinovou rezistenci. (2) Sekvence DNA (o velikosti 1600 bp) s genem pro *Renilla* luciferázu získaným PCR reakcí s primery K1_UCS8_RLuc_F2 / K1_UCSx_RLuc_R2. Jako hmotnostní marker byl použit GeneRulerTM 100 bp Plus DNA Ladder.

Připravené DNA fragmenty nesoucí gen pro hygromycinovou rezistenci a gen kódující *Renilla* luciferázu byly vhodné pro vytvoření výsledné kazety metodou fúzní PCR s primery 5'RACE_03_K1_2 / K1_UCSx_RLuc_R2 (4.2.1.9.1). Po PCR reakci proběhlo

elektroforetické rozdělení směsi v 0,5% agarózovém gelu (4.2.1.3) a následná izolace (4.2.1.1.7). Správnost izolace byla ověřena pomocí 0,8% agarózové elektroforézy (4.2.1.3) (**Obr. 40**). PCR reakce byla provedena ve více opakováních za účelem vytvoření co nejvíce reportérových kazet.

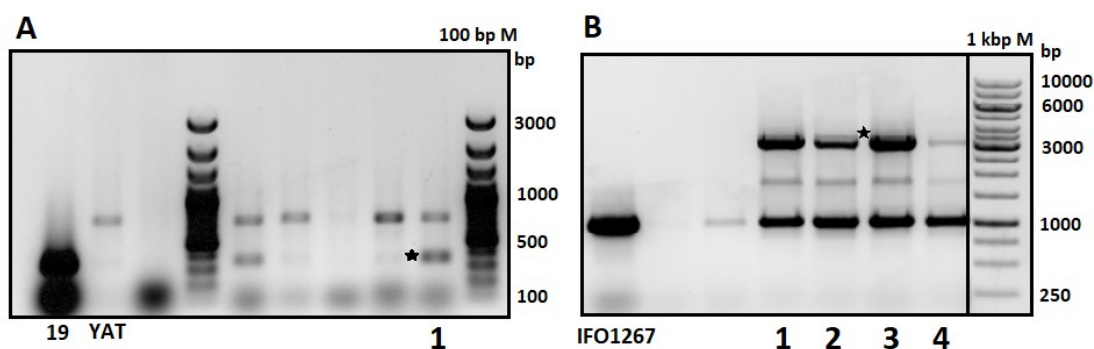


Obr. 40: Reportérové kazety vytvořené pomocí fúzní PCR. PCR byla provedena v sedmi opakováních (označení jednotlivých opakování číslicemi 1–7). Hvězdička označuje produkt o předpokládané velikosti (2600 bp) představující hotovou reportérovou kazetu. Jako hmotnostní markery byly použity GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder a GeneRuler™ 1 kbp DNA Ladder.

Po vytvoření kazety nesoucí reportérový gen a gen pro rezistenci vůči hygromycinu bylo možné provést transformaci (4.2.1.10.3) do kvasinkových kmenů *K. lactis* IFO1267 a *S. cerevisiae* YAT nesoucích plasmidy pGKL. Po transformaci byly kvasinkové buňky vysety na selekční plotny s hygromycinem. Získané kolonie byly přečárkovány na nové selekční plotny a poté byly analyzovány pomocí PCR (4.2.1.9). V obou případech musela být jak transformace kvasinkových buněk, tak analytická PCR několikrát opakována. Důvodem byla buď nepřítomnost kolonií přímo po transformaci, nebo negativní výsledky analytické PCR.

DNA získaná izolací (4.2.1.1.5) z transformovaných kvasinkových buněk *S. cerevisiae* YAT byla analyzována pomocí PCR (4.2.1.9) s primery RLuc_5_Seq / Hygro_tail. V případě přítomnosti genu pro *Renilla* luciferázu, konkrétně jeho 5' konce, měl být pozorován výsledek PCR v podobě amplifikované DNA o délce 367 bází. Výsledek byl vizualizován pomocí agarózové elektroforézy (4.2.1.3) v 0,8% gelu (**Obr. 41**). Z pozitivních kolonií byla vybrána jedna, jež byla následně 4x pasážována (4.2.4.7). Po pasáži byly kvasinky vysety na selekční plotny v ředěních 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} a 10^{-7} . Narostlé kolonie byly opět analyzovány pomocí analytické PCR (4.2.1.9), tentokrát za použití primerů 5_RACE_03_K1_2 / 5_RACE_04_K1. Pozitivní výsledek, tedy DNA o velikosti

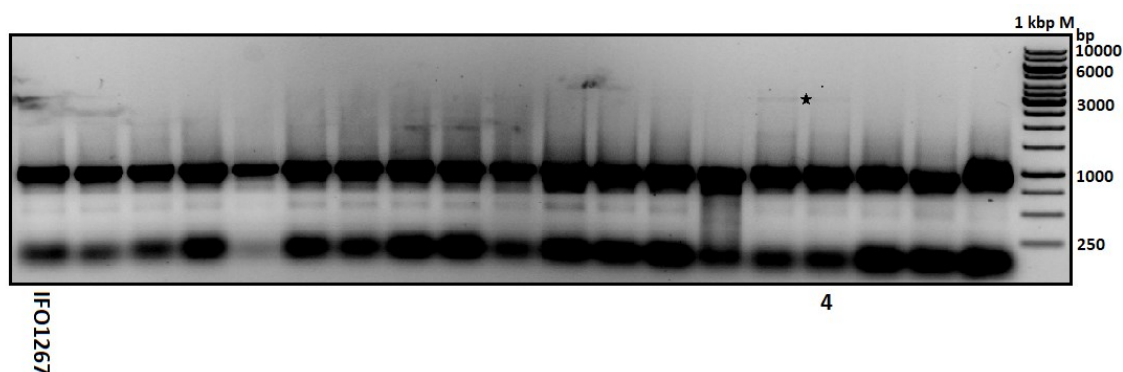
3026 bází, byl pozorován u tří testovaných kolonií, z nichž byl vybrán klon 2. Výsledek PCR byl opět pozorován pomocí agarózové elektroforézy v 0,8% gelu (4.2.1.3) (**Obr. 41**). Z tohoto klonu byl vytvořen lyzát (4.2.3.1), kde byla změřena koncentrace proteinů (4.2.3.2) a luminiscence předpokládané luciferázy *Renilla* (4.2.3.3) (popsáno v kapitole 5.3.2).



Obr. 41: (A) analytická PCR s primery *RLuc_5_Seq* / *Hygro_tail* provedená u rekombinantních klonů *S. cerevisiae* YAT s pravděpodobnými rekombinantními plasmidy *pGKL1*. Přítomnost kazety v *pGKL1* je dána pomocí výsledné amplifikované DNA o délce 367 bází (černá hvězdička). Tento výsledek byl pozorován u klonu 1, který byl vybrán pro další analýzy. YAT: negativní kontrola, 19: pozitivní kontrola. (B) Analytická PCR s primery *5_RACE_03_K1_2* / *5_RACE_04_K1*. Amplifikovaná DNA o velikosti 3026 bází představuje pozitivní výsledek, jenž byl pozorován u klonu 3. IFO1267: negativní kontrola. Jako hmotnostní markery byly použity *GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder* a *GeneRuler™ 1 kbp DNA Ladder*.

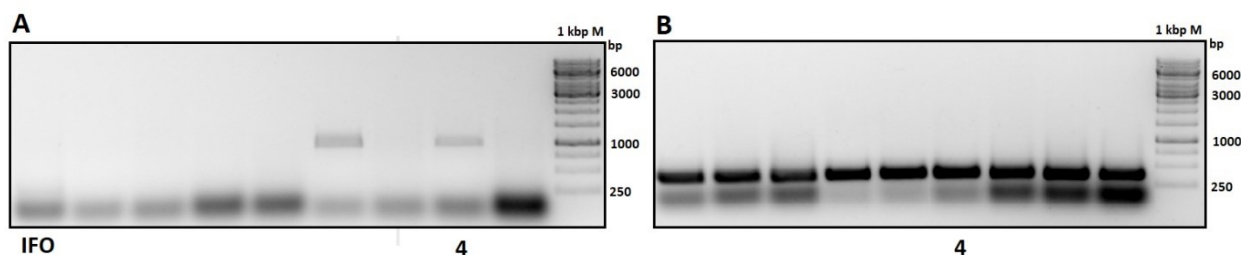
Po získání reportéru 2 v kvasinkovém kmeni *S. cerevisiae* YAT jsme se zaměřili na vytvoření stejné kazety, tentokrát v kmeni *K. lactis* IFO1267. Vzhledem k tomu, že se nepodařilo vytvořit pozitivní transformované klony při použití kazety vytvořené fúzní PCR, rozhodli jsme se nejdříve kazetu namnožit pomocí PCR (4.2.1.9) a za přítomnosti primerů *5_RACE_03_K1_2* / *5_RACE_04_K1*. Jako templát byla použita kazeta z dříve připraveného rekombinantního kmene *S. cerevisiae* YAT. Po PCR byla amplifikovaná reportérová kazeta izolována z 0,5% agarózového gelu (4.2.1.1.7). Reportérová kazeta byla transformována (4.2.1.10.3) do kvasinkového kmene *K. lactis* IFO1267. Kvasinkové buňky byly vysety na selekční plotny a narostlé kolonie analyzovány. Nejdříve proběhla analýza pomocí metody PCR (4.2.1.9) s primery *5_RACE_03_K1_2* / *5_RACE_04_K1*, kdy se

očekával produkt DNA o velikosti 3026 bází, což bylo pozorováno pomocí elektroforetické separace na 0,8% gelu (4.2.1.3) (**Obr. 42**).



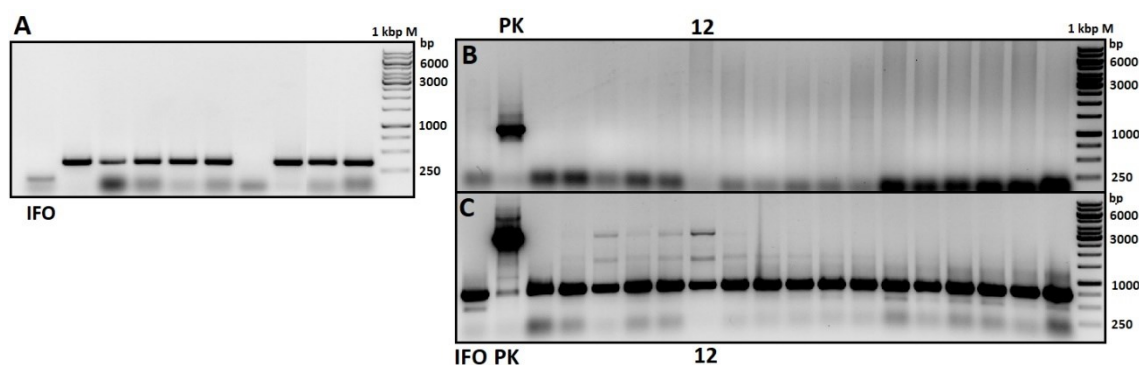
Obr. 42: Analytická PCR s primery 5'RACE_03_K1_2 / 5'RACE_04_K1 ověřující přítomnost reportérové kazety v kvasinkovém kmeni *K. lactis* IFO1267. Přítomnost kazety je dána přítomností produktu PCR o velikosti 3026 bází, což bylo pozorováno u klonu 4) označeno černou hvězdičkou). Klon 4 byl použit na další analýzy. Jako hmotnostní marker byl použit GeneRuler™ 1 kbp DNA Ladder.

Vzhledem k ne příliš jasnému výsledku první analytické PCR byla provedena další PCR (4.2.1.9), tentokrát s primery RLuc_5_Seq / Hygro_tail a RLuc_3_Seq / 5'RACE_04_K1. Ověření PCR bylo opět provedeno pomocí elektroforézy (4.2.1.3) v 0,8% gelu (**Obr. 43**).



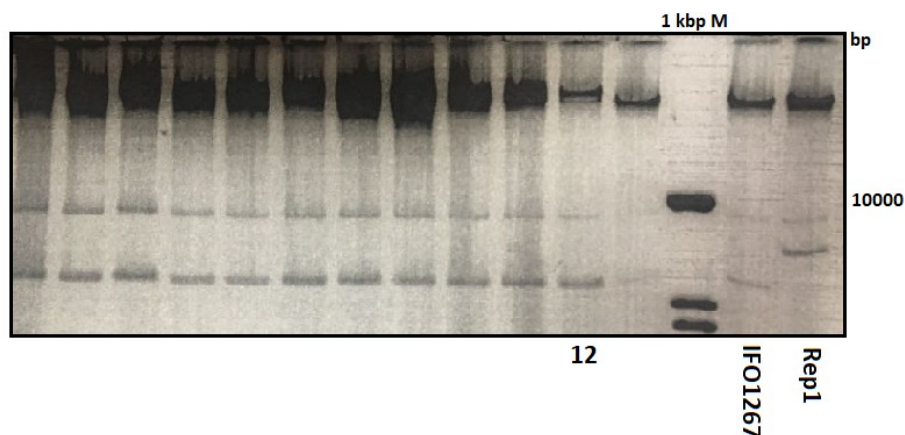
Obr. 43: (A) Analytická PCR s primery RLuc_3_Seq / 5'RACE_04_K1. Přítomnost kazety je dána přítomností produktu PCR o velikosti 602 bází, což neodpovídá, každopádně jsme se rozhodli s klonem 4 dále pracovat. (B) Analytická PCR s primery RLuc_5_Seq / Hygro_tail. Přítomnost kazety je dána přítomností produktu PCR o velikosti 376 bází, což bylo mimo jiné pozorováno u klonu 4. Jako hmotnostní marker byl použit GeneRuler™ 1 kbp DNA Ladder.

Pro další analýzy byl vybrán částečně pozitivní klon 4, i přes ne příliš jasné výsledky. Klon 4 byl dále 4x pasážován (4.2.4.7). Po pasáži byly kvasinkové buňky vysety na selekční plotny v ředěních 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} a 10^{-7} . Ze získaných kolonií byla opět izolována DNA (4.2.1.1.5), která byla následně ověřena na přítomnost reportérové kazety pomocí PCR (4.2.1.9) za použití primerů RLuc_5_Seq / Hygro_tail, 5_RACE_03_K1_2 / 5_RACE_04_K1 a KO8 / RLuc_3_Seq. Primer KO8 je situován přímo do promotorové sekvence *K2ORF8*, v jejíž přítomnosti by měl vzniknout po amplifikaci produkt, což nebylo pozorováno (**Obr. 44**). PCR reakce byly ověřeny pomocí elektroforetické separace v 0,8% agarózovém gelu (4.2.1.3) (**Obr. 44**).



Obr. 44: (A) Analytická PCR s primery RLuc_5_Seq / Hygro_tail, kdy měl být pozorován band o velikosti 367 bp, což bylo pozorováno u většiny klonů. (B) Analytická PCR provedena s primery KO8 / RLuc_3_Seq. Proužek o předpokládané velikosti 1000 bp nebyl pozorován u žádného z testovaných klonů. (C) Analytická PCR s primery 5_RACE_03_K1_2 / 5_RACE_04_K1. Proužek o správné velikosti 3026 bp byl pozorován u klonu 12, který byl vybrán pro následné analýzy. PK: pozitivní kontrola představující hotovou reportérovou kazetu 1, IFO: DNA z kmene *K. lactis* IFO1267. Jako hmotnostní marker byl použit GeneRulerTM 1 kbp DNA Ladder.

Dále byla plasmidová DNA izolována metodou 4.2.1.1.2 a byla provedena elektroforetická separace (4.2.1.3) získaných klonů. Elektroforetycký gel ukazuje **Obr. 45**.



Obr. 45: Dlouhá elektroforéza klonů pravděpodobně obsahujících reportérovou kazetu v pGKL1 plasmidu s reportérovým genem pod kontrolou promotoru K2ORF8. U klonů není pozorovaná změna velikosti pGKL1 plasmidu, ovšem předešlé analytické PCR u klonu 12 částečně potvrdily přítomnost kazety. Proto byl klon 12 dále pasážován, zatím bez publikovaného výsledku. IFO1267: Kontrolní plasmidová DNA nativního plasmidu pGKL1 z *K. lactis* IFO1267, Rep1: pozitivní kontrola, rekombinantní plasmid pGKL1 obsahující reportérovou kazetu s reportérovým genem pod kontrolou promotoru K1ORF2. Jako hmotnostní marker byl použit GeneRuler™ 1 kbp DNA Ladder.

I přes to, že klon 12 nevykazoval stoprocentní přítomnost reportérové kazety jako součásti pGKL1 plasmidu, rozhodli jsme se vytvořit buněčné lyzáty (4.2.3.1), změřit koncentraci proteinů (4.2.3.2) a následně změřit luminiscenci (4.2.3.3) (výsledek popsán v kapitole 5.3.2).

5.3 MĚŘENÍ AKTIVITY REPORTÉROVÝCH GENŮ

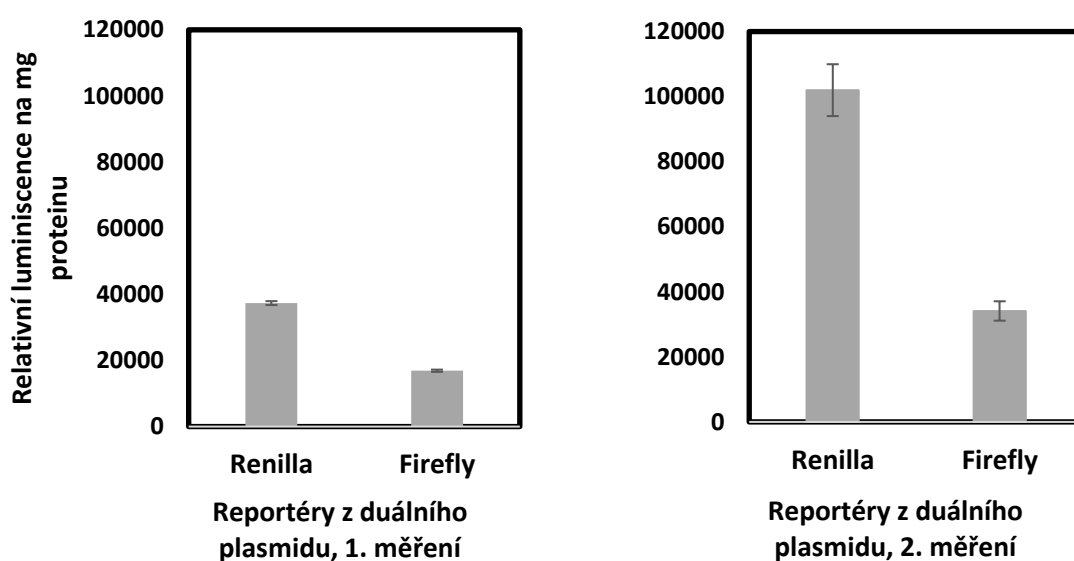
Byly vytvořeny dva typy konstruktů pro studium vlivu adenosinových zbytků na 5' konci mRNA na translaci. Nejdříve se jednalo o duální expresní plasmid, nesoucí dvě rozdílné luciferázy pod kontrolou dvou odlišných promotorů, konkrétně luciferázy *Renilla* a *firefly*. Plasmidové geny jsou exprimovány v jádře kvasinkových buněk. Druhým typem konstruktů byly reportérové kazety jako součást pGKL1 plasmidu. Jedna kazeta byla vložena pod kontrolu promotoru *K1ORF2*, za předpokládaného vzniku transkriptů s netemplátovým 5' poly(A) koncem. Druhá kazeta byla vložena rovněž do plasmidu pGKL1 pod kontrolu promotoru *K2ORF8*, jehož transkripty nesou 5' čepičku. Jako reportérový gen byla v obou případech použita *Renilla* luciferáza. Kazety měly být vloženy do dvou kvasinkových kmenů *K. lactis*, IFO1267 a *S. cerevisiae* YAT, jež postrádá mitochondriální DNA. S jistotou se nám podařilo vytvořit rekombinovaný plasmid pGKL1 s reportérovým genem pod kontrolou promotoru *K1ORF2* v kvasinkovém kmeni *K. lactis* IFO1267. Slibné výsledky rovněž vykazovala kazeta s reportérovým genem pod kontrolou promotoru *K2ORF8* v kvasinkovém kmeni *S. cerevisiae* YAT.

Po úspěšném ověření správně vytvořených reportérových systémů, duálního vektoru pCEV-G1-G418-RLuc-FLuc a reportérových kazet v pGKL1 ve dvou rozdílných kvasinkových kmenech, bylo možné změřit aktivitu luciferáz, která nám ukázala úroveň exprese příslušných genů pod kontrolou daných promotorů. Nejdříve byly z jednotlivých kvasinkových klonů vytvořeny buněčné lyzáty (4.2.3.1), které bylo možné uchovat při teplotě -80 °C. Následně proběhlo stanovení koncentrace proteinů v lyzátech (4.2.3.2). Jako poslední byla měřena luminiscence luciferáz (4.2.3.3). Reálná hodnota luminiscence byla stanovena pomocí přesného stanovení koncentrace proteinů v lyzátech.

5.3.1 Aktivita *Renilla* a *firefly* z pCEV-G1-G418-RLuc-FLuc

Poté, co se podařilo vytvořit duální reportérový systém kódovaný kvasinkovým plasmidem pCEV-G1-G418-RLuc-FLuc, bylo rovněž potřeba ověřit aktivitu luciferáz, jež slouží jako reportérové proteiny a jejichž kódující geny jsou součástí výše zmíněného plasmidu. Měření bylo provedeno způsobem popsáním výše. Výsledkem je grafické znázornění luminiscence, jakožto aktivity obou luciferáz (**Obr. 46**). Měření bylo

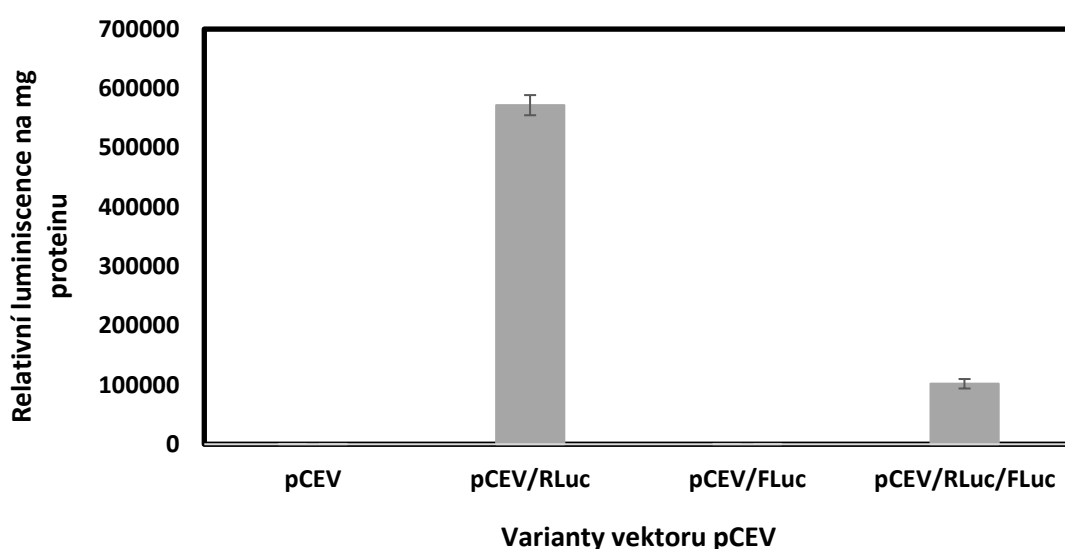
provedeno ve dvou biologických opakováních, na sobě nezávislých. První měření vykazovalo všeobecně nižší úroveň luminiscence obou luciferáz v porovnání se druhým měřením, avšak je možné sledovat trend, jenž ukazuje, že při prvním i druhém měření vykazovala *Renilla* luciferáza vyšší aktivitu v porovnání s *firefly* luciferázou. Gen pro *Renilla* luciferázu je pod v plasmidu pod kontrolou promotoru TEF1, zatím co gen pro *firefly* luciferázu je pod kontrolou promotoru PGK1. Rozdílná aktivita obou luciferáz ukazuje na rozdílnou sílu zmíněných promotorů. Každopádně se podařilo ověřit funkčnost reportérového systému plasmidu pCEV-G1-G418-RLuc-FLuc.



Obr. 46: Relativní luminiscence *Renilla* luciferázy a *firefly* luciferázy z reportérového systému kódovaným plasmidem pCEV-G1-G418-RLuc-FLuc, zobrazující dvě rozdílná měření. Aktivita *Renilla* luciferázy je v obou případech vyšší než aktivita *firefly* luciferázy. Můžeme rovněž sledovat podstatný rozdíl v aktivitě obou luciferáz v závislosti na provedených měřeních, kdy v případě 1. měření je aktivita výrazně nižší oproti 2. měření. Avšak trend zůstává stejný. Sloupce grafů znázorňují průměr a směrodatnou odchylku pro $n = 3$.

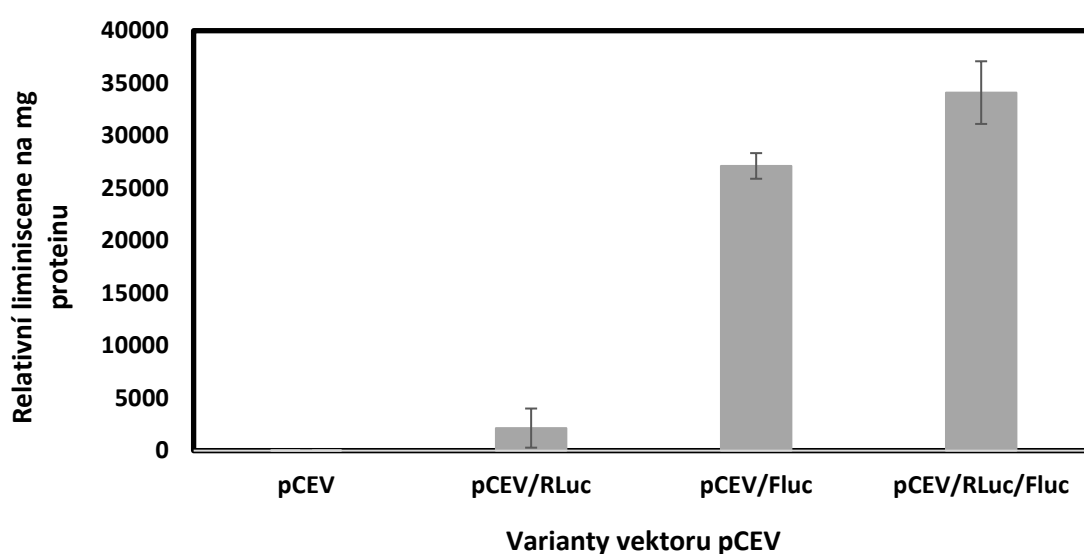
Součástí práce byla nejen tvorba duálního kvasinkového vektoru pCEV-G1-G418-RLuc-FLuc, ale rovněž jeho dvou variant, pCEV-G1-G418-RLuc a pCEV-G1-G418-FLuc, kdy součástí těchto plasmidů byl jen jeden z reportérových genů. Z obou plasmidů byly vytvořeny lyzáty a následně byla změřena aktivita reportérových proteinů. Jako kontrola byl použit plasmid pCEV-G1-G418 bez reportérových genů. Aktivita luciferázy *Renilla* byla rovněž měřena u plasmidu pCEV-G1-G418-FLuc a *vice versa*. Výslednou

luminiscenci luciferázy *Renilla* ukazuje **Obr. 47**. Podle předpokladu u vzorku pocházejícího od plasmidu pCEV-G1-G418 nebyla pozorována žádná luminiscence, podobně jako u plasmidu pCEV-G1-G418-FLuc, který postrádá gen pro *Renilla* luciferázu. U plasmidů pCEV-G1-G418-RLuc a pCEV-G1-G418-RLuc-FLuc obsahujících gen pro *Renilla* luciferázu byla naměřena aktivita *Renilla* luciferázy, ale překvapivě v poměrně odlišných hladinách. *Renilla* luciferáza pocházející z plasmidu pCEV-G1-G418-RLuc vykazovala vyšší míru aktivity oproti *Renilla* luciferáze z duálního plasmidu, jenž navíc kóduje i gen pro *firefly* luciferázu. Mohl by se tedy předpokládat inhibiční účinek složek reakční směsi na aktivitu *Renilla* luciferázy, který by mohl rovněž spočívat v rozdílné míře genové exprese reportérových genů v závislosti na plasmidu, jež je nese.



Obr. 47: Relativní luminiscence reportérové luciferázy *Renilla*. Luminiscence byla měřena u všech čtyř variant vektoru pCEV, tedy u plasmidu bez reportérového genu pCEV-G1-G418 (pCEV), plasmidu kódujícího gen pouze pro *Renilla* luciferázu (pCEV/RLuc), plasmidu kódujícího pouze gen pro *firefly* luciferázu (pCEV/FLuc) a duálního plasmidu, jenž kóduje obě luciferázy (pCEV/RLuc/FLuc). Podle předpokladu u vzorků pocházejících od plasmidů pCEV-G1-G418 a pCEV-G1-G418-FLuc nebyla naměřena žádná aktivita *Renilla* luciferázy. Překvapivě byla naměřena výrazně vyšší aktivita *Renilla* luciferázy u plasmidu pCEV-G1-G418-RLuc, jenž kóduje jeden reportérový gen, a sice pro *Renilla* luciferázu v porovnání s aktivitou *Renilla* luciferázy kódované plasmidem pCEV-G1-G418-RLuc-FLuc. Sloupce grafů znázorňují průměr a směrodatnou odchylku pro $n = 3$.

Podobně byla měřena aktivita i luciferázy *firefly*. Stejně jako v předchozím případě byly použity lyzáty všech čtyř variant plasmidů pCEV: pCEV-G1-G418, sloužícího jako kontrola, pCEV-G1-G418-RLuc, pCEV-G1-G418-FLuc a pCEV-G1-G418-RLuc-FLuc. Stejně jako v předchozím případě nebyla pozorována žádná luminiscenční aktivita u vzorku pCEV-G1-G418. Co však bylo poměrně překvapivé, vzorek pocházející z plasmidu pCEV-G1-G418-RLuc vykazoval sice nízkou, ale stále detekovatelnou luminiscenci *firefly* luciferázy. Dalším zajímavým zjištěním je relativní luminiscence u *firefly* luciferázy pocházející z plasmidu pCEV-G1-G418-RLuc-FLuc, která byla vyšší než u plasmidu pCEV-G1-G418-FLuc. Tento rozdíl může být dán pozadím detekovaným u vzorku pCEV-G1-G418-RLuc.

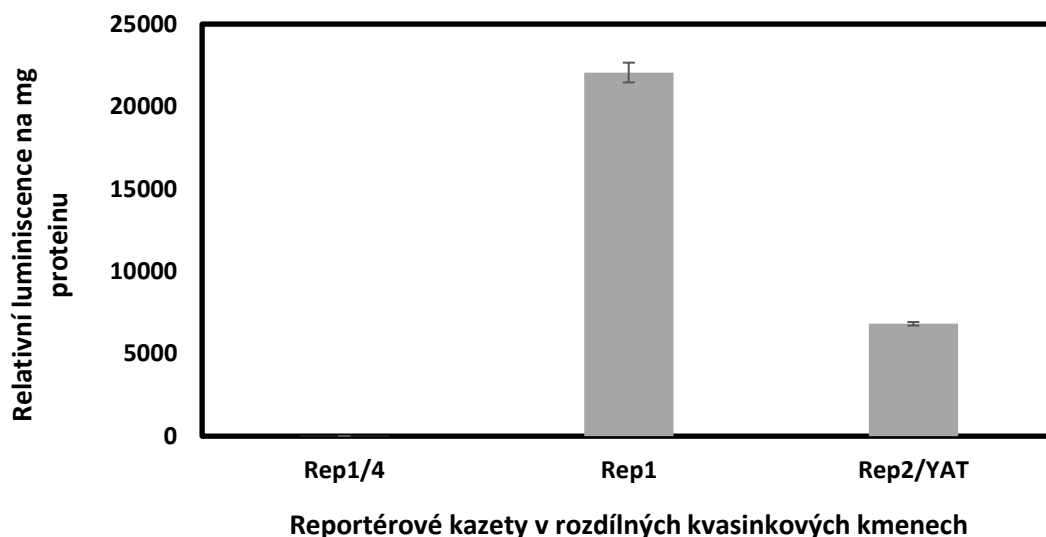


Obr. 48: Relativní luminiscence reportérové luciferázy *firefly*. Luminiscence byla měřena u všech čtyř variant vektoru pCEV, tedy u plasmidu bez reportérového genu pCEV-G1-G418 (pCEV), plasmidu kódujícího gen pouze pro Renilla luciferázu (pCEV/RLuc), plasmidu kódujícího pouze gen pro *firefly* luciferázu (pCEV/FLuc) a duálního plasmidu, jenž kóduje obě luciferázy (pCEV/RLuc/FLuc). Podle předpokladu u plasmidu pCEV-G1-G418 nebyla naměřena žádná luciferázová aktivita. U plasmidu pCEV-G1-G418-RLuc byla na rozdíl od očekávání aktivita naměřena, a to podstatně nezanedbatelná. u plasmidu pCEV-G1-G418-FLuc je aktivita pozorována, avšak je menší než u duálního vektoru. Sloupce grafů znázorňují průměr a směrodatnou odchylku pro $n = 3$.

5.3.2 Aktivita *Renilla* luciferázy z pGKL1 plasmidu

Po vytvoření reportérových kazet nesoucích gen pro *Renilla* luciferázu a jejich vložení do kvasinkových kmenů *K. lactis* IFO1267 a *S. cerevisiae* YAT, bylo možné změřit aktivitu reportérového proteinu. Aktivita byla měřena u reportérové kazety nesoucí reportérový gen pod kontrolou promotoru *K1ORF2*, jenž byla exprimována v kmeni *K. lactis* IFO1267. Dále byla měřena aktivita reportérového proteinu exprimovaného z genu pod kontrolou promotoru *K2ORF8*, jenž byl exprimován ve dvou kvasinkových kmenech *K. lactis* IFO1267 a *S. cerevisiae* YAT. Bohužel se nepodařilo vytvořit reportérový systém nesoucí gen pro *Renilla* luciferázu pod kontrolou promotoru *K1ORF2* v kvasinkovém kmeni *S. cerevisiae* YAT.

Měření luciferázové aktivity probíhalo celkem dvakrát. Nejdříve to bylo se vzorky Rep1/4 (reportérový gen pod kontrolou promotoru *K1ORF2*, klon 4, v kmeni *K. lactis* IFO1267), kde je podle výsledků sekvenace vložená reportérová kazeta neúplná, dále Rep1 (reportérový gen pod kontrolou promotoru *K1ORF2*, v kmeni *K. lactis* IFO1267), který je podle sekvenace v pořádku a Rep2/YAT (reportérový gen pod kontrolou promotoru *K2ORF8*, v kmeni *S. cerevisiae* YAT). Při prvním měření nebyla detekovaná žádná aktivita *Renilla* luciferázy u vzorku Rep1/4, což je dáno pravděpodobně tím, že je proteinový produkt nefunkční a postrádá svoji enzymatickou aktivitu. Naproti tomu funkční produkt, který je rovněž i dobře exprimovaný, vzniká z reportérového genu pod kontrolou promotoru *K1ORF2*, v kmeni *K. lactis* IFO1267. Poslední z měřených vzorků Rep2/YAT rovněž vykazoval detekovatelnou aktivitu *Renilla* luciferázy, která ovšem byla oproti Rep1 nižší (**Obr. 49**). To může být dáno rozdílnou mírou exprese reportérového genu v závislosti na kvasinkovém kmeni, nebo v případě transkriptů Rep1 (kde je reportérový gen pod kontrolou promotoru umožňujícího netmplátovou polyadenylaci na 5' konci mRNA) může být zvýšená míra exprese dána netemplátovými adenosiny na jejich 5' konci, které transkripty Rep2/YAT postrádají.



Obr. 49: Aktivita *Renilla* luciferázy vyjádřená relativní luminiscencí. Luciferáza *Renilla* pochází z reportérových kazet, jež jsou součástí plasmidu pGKL1. Byly měřeny celkem tři vzorky. U Rep1/4, kde je reportérový gen pouze částečný a pod kontrolou promotoru *K1ORF2*, nebyla naměřena žádná enzymatická aktivita. U Rep1, kde je reportérový gen celý a pod kontrolou promotoru *K1ORF2* byla naměřena enzymatická aktivita, což ukazuje na vznik funkčního reportérového proteinu. U Rep2/YAT, kde je reportérový gen pod kontrolou promotoru *K2ORF8* v kmeni *S. cerevisiae* YAT byla rovněž naměřena enzymatická aktivita *Renilla* Luciferázy, avšak v menší míře v porovnání s Rep1. To může být dáno rozdílnou mírou genové exprese v závislosti na kvasinkovém kmeni či složení transkriptů. Sloupce grafů znázorňují průměr a směrodatnou odchylku pro $n = 3$.

Měření luciferázové aktivity bylo opakováno. Byly vytvořeny nové lyzáty (4.2.3.1) a následně byla měřena koncentrace proteinů (4.2.3.2) a luminiscence (4.2.3.3). Mimo vzorky Rep1/4, Rep1 a Rep2/YAT byla změřena i nově vytvořená kazeta v kvasinkovém kmeni *K. lactis* IFO1267 Rep2. Jako kontrola byla rovněž měřena aktivita proteinů z lyzátu IFO1267 s pGKL plasmidy bez reportérových kazet. Stejně jako v předchozím případě nejvyšší luciferázovou aktivitu vykazoval vzorek Rep1, kde byla potvrzena přítomnost celé kazety s reportérovým genem. Detekovatelná aktivita byla rovněž měřena u vzorku Rep2/YAT, avšak byla nezanedbatelně nižší než v prvním měření. Překvapivě nebyla detekována žádná enzymatická aktivita u vzorku Rep2. Následná sekvenace sice potvrdila

přítomnost kazety v pGKL1 plasmidu u Rep2, nicméně v tomto případě pravděpodobně nedošlo k dokonalému vyředění nerekombinantního plasmidu pGKL1.

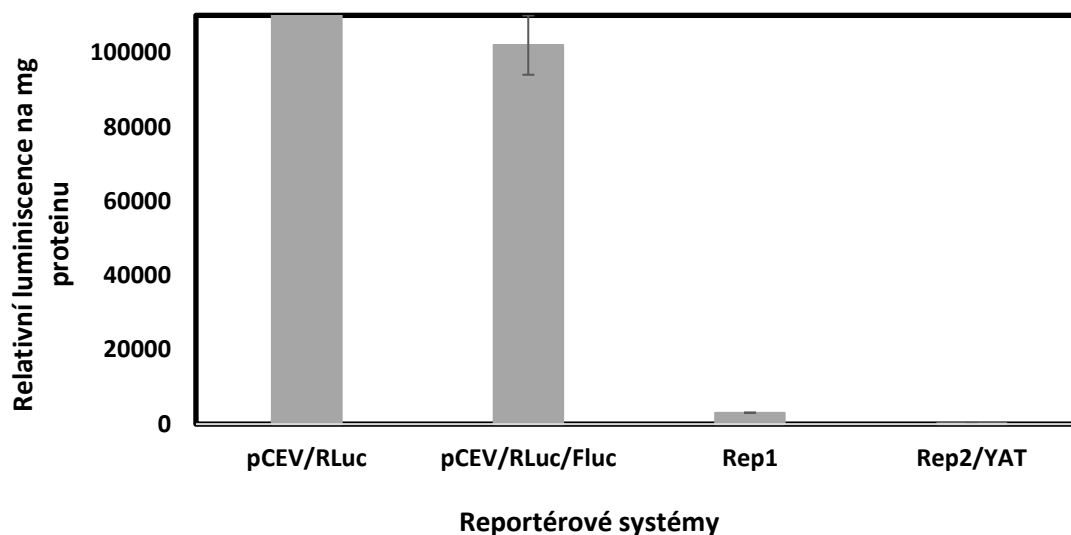


Obr. 50: Aktivita *Renilla* luciferázy vyjádřená relativní luminiscencí. Luciferáza *Renilla* pochází z reportérových kazet, jež jsou součástí plasmidu pGKL1. Bylo měřeno celkem pět vzorků. Jako kontrola sloužil vzorek *K. lactis* kmen IFO1267, kdy nebyla součástí pGKL1 reportérová kazeta. Podle předpokladu nebyla naměřena žádná enzymatická aktivita. Aktivita byla pozorována u Rep1, kde se nacházela reportérová kazeta. U Rep2/YAT byla rovněž pozorována aktivita *Renilla* luciferázy, avšak oproti prvnímu měření (**Obr. 49**) byla výrazně menší. U Rep1/4 byla stejně jako v předchozím případě nepotvrzena. U Rep2, kde by měla být kazeta s reportérovým genem pod kontrolou K2ORF8, nebyla rovněž žádná enzymatická aktivita reportérového enzymu pozorována. Sloupce grafů znázorňují průměr a směrodatnou odchylku pro $n = 3$.

Závěrem je, že se nám pravděpodobně podařilo vytvořit pouze jednu plně funkční reportérovou kazetu jakožto součást plasmidu pGKL1. Jedná se o kazetu obsahující reportérový gen pro *Renilla* luciferázu a gen pro hygromycinovou rezistenci pod kontrolou promotoru *K1ORF2*.

Dále jsme se rozhodli porovnat aktivity *Renilla* luciferázy v námi vytvořených reportérových systémech, a sice u plasmidů pCEV-G1-G418-RLuc, pCEV-G1-G418-RLuc-FLuc a u reportérových kazet, jež jsou součástí pGKL1 plasmidu, tj. Rep1 a Rep2/YAT. Výsledné porovnání ukazuje **Obr. 51**. V lyzátech obsahujících *Renilla* luciferázu z duálního expresního vektoru pCEV-G1-G418-RLuc-FLuc a u stejného vektoru

bez genu pro *firefly* luciferázu byla ve srovnání s Rep1 pozorována vysoká aktivita *Renilla* luciferázy. Aktivita *Renilla* luciferázy u Rep2/YAT byla zanedbatelná. Toto naznačuje, že síla kvasinkového promotoru TEF1, který je součástí plasmidu pCEV-G1-G418-RLuc-FLuc a pCEV-G1-G418-RLuc a pod jehož kontrolou je gen pro *Renilla* luciferázu je výrazně větší než síla promotoru *K1ORF2*, který se přirozeně nachází u pGKL1 plasmidu.



Obr. 51: Porovnání aktivity *Renilla* luciferázy, jejíž gen je kódován různými reportérovými systémy. Aktivita *Renilla* luciferázy pocházející z duálního kvasinkového vektoru pCEV-G1-G418-RLuc-FLuc a z vektoru pCEV-G1-G418-RLuc byla v porovnání s aktivitou *Renilla* luciferázy z reportérové kazety Rep1 výrazně vyšší, což je pravděpodobně způsobeno rozdílnou silou promotorů TEF1 a K1ORF2. Aktivita *Renilla* luciferázy z Rep2/YAT byla v porovnání s ostatními vzorky zanedbatelná. Sloupce grafů znázorňují průměr a směrodatnou odchylku pro $n = 3$.

6 DISKUZE

Součástí řešení diplomové práce byla tvorba reportérového systému v podobě duálního kvasinkového expresního plasmidu. Byl vybrán plasmid pCEV-G1-Ph (Vickers *et al*, 2013), který byl již předem konstruován tak, aby mohl nést dva reportérové geny pod kontrolou dvou rozdílných promotorů a jehož exprese je možná v kvasinkových kmenech *S. cerevisiae*. Plasmid nese silné kvasinkové promotory TEF1 (regulující expresi genu pro transkripční elongační faktor EF-1 α) a PGK1 (regulující expresi genu pro fosfoglycerát kinázu). Jako reportérové geny jsme vybrali dvě rozdílné luciferázy, konkrétně *Renilla* a *firefly* luciferázy, jejichž geny byly následně klonovány pod kontrolu zmíněných promotorů v duálním plasmidu. Pod promotor TEF1 byl vložen gen pro *Renilla* luciferázu a pod promotor PGK1 byl vložen gen pro *firefly* luciferázu. U plasmidu byl rovněž měněn gen rezistence proti phleomycinu za gen rezistence vůči antibiotiku G418. Následně byla měřena aktivita zmíněných luciferáz, jakožto produktů právě nově konstruovaného plasmidu pCEV-G1-G418-RLuc-FLuc. Mohli jsme sledovat poměrně nižší míru aktivity luciferázy *firefly*, exprese jejíhož genu je kontrolována PGK1 promotorem oproti *Renilla* luciferáze, s genem pod kontrolou TEF1 (viz kapitola 5.3.1). Nižší míra exprese reportérových genů pod kontrolou PGK1 promotoru byla pozorována již dříve (Vickers *et al*, 2013) za využití β -galaktosidázového reportérového systému v porovnání se silou promotoru TEF1. Naproti tomu studie (Partow *et al*, 2010), kde byla studována síla kvasinkových promotorů v závislosti na přítomnosti glukózy, následné fermentace a postupné přítomnosti ethanolu v médiu, popsala sílu promotorů TEF1 a PGK1 jakožto srovnatelnou, pokud byla v médiu přítomna glukóza. Jakmile byla veškerá glukóza metabolizována a v médiu zbyl pouze ethanol, měnila se i aktivita promotoru PGK1, která klesla cca o 50%. Naopak aktivita promotoru TEF1 stoupla téměř dvojnásobně (Partow *et al*, 2010). Naše dvě nezávislá měření aktivit luciferáz tedy odpovídají publikovaným poznatkům.

Plasmid pCEV-G1-G418-RLuc-FLuc byl v této práci primárně konstruován pro studium vlivu počtu adenosinových zbytků na 5' konci transkriptů reportérových genů na iniciaci translace. Aby bylo toto studium možné, bylo třeba co nejpřesněji stanovit přesné místo iniciace transkripce (TSS, *Transcription Start Site*) transkriptů regulovaných promotory PGK1 a TEF1. Toto místo bude v budoucnu modifikované pomocí oligonukleotidem řízené mutagenyze tak, aby výsledné transkripty obsahovaly na svém 5'

konci definovaný počet adenosinů. Pro zjištění přesné pozice TSS reportérových genů pod kontrolou obou výše zmíněných promotorů byla provedena 5' RACE PCR cDNA pocházejících z transkriptů reportérových genů. PGK1 promotor obsahuje sekvenci označovanou jako tzv. místo transkripčního startu 5'-CAAG-3', kde první adenosin představuje rovněž první transkribovaný nukleotid (Rathjen a Mellor, 1990). Tato sekvence se nejčastěji nachází ve vzdálenosti -46 až -40 nukleotidů od ATG start kodónu (Zhang a Dietrich, 2005). Důležitou sekvencí pro určení místa transkripčního startu je sekvence označovaná jako determinátor, která se nachází v bezprostřední blízkosti sekvenace 5'-CAAG-3' a její nukleotidová posloupnost je 5'-ACAGATC-3' (Rathjen a Mellor, 1990). Pomocí sekvenace 5'RACE PCR produktů pocházejících z transkriptů genu pod kontrolou PGK1 promotoru jsme zjistili, že nejvíce transkriptů obsahovalo místo transkripčního startu ve vzdálenosti -46 nukleotidů od start kodónu, což je v souladu s dostupnou literaturou. Nicméně při analýze 5'RACE transkriptů pod kontrolou PGK1 promotoru byly nalezeny i transkripty delší (viz **Obr. 22**), což znamená, že transkripty regulované promotorem PGK1 mohou iniciovat z vícero míst. Pro přesnější analýzu a odhalení dalších případných TSS transkriptů regulovaných promotorem PGK1 plánujeme osekvenovat více klonů. Oproti předchozímu očekávanému zjištění dopadla analýza transkriptů pod kontrolou promotoru TEF1 vcelku překvapivě. Dle dostupných informací by se sekvence transkripčního startu promotoru TEF1 měla nacházet ve vzdálenosti -32 nebo -31 nukleotidů od ATG start kodónu (Nagashima *et al*, 1986, Rathjen a Mellor, 1990, Zhang a Dietrich, 2005). To se v našem případě nepotvrdilo, naopak naprostá většina TSS transkriptů pod kontrolou TEF1 se nachází ve vzdálenosti -61 nukleotidů od ATG start kodónu. Stejně jako v předchozím případě bude třeba pro přesnější analýzu a odhalení dalších případných TSS transkriptů regulovaných promotorem TEF1 osekvenovat více klonů. Po stanovení přesného majoritního TSS obou promotorů budeme vybrané místo modifikovat oligonukleotidem řízenou mutagenezí ve výsledku vedoucí k přidání různého počtu adenosinových zbytků na samém 5' konci vznikajících mRNA s následným měřením vlivu těchto adenosinů na sílu translace měřenou stanovením aktivity konkrétní luciferázy. Druhá luciferázová aktivita bude použita jako normalizační marker.

Dalším cílem práce byla tvorba expresních kazet přímo v lineárních cytoplasmatických plasmidech pGKL. Jako reportérový gen byl rovněž vybrán gen pro *Renilla* luciferázu, který byl situován pod kontrolu dvou promotorů K1ORF2 a K2ORF8. Po vložení kazet do kvasinkových kmenů *K. lactis* IFO1267 a *S. cerevisiae* YAT a po následném ověření správné homologní rekombinace bylo možné změřit aktivitu *Renilla*

luciferázy. Rozdílná síla promotorů TEF1 a PGK1 z plasmidu pCEV-G1-G418-RLuc-FLuc byla již zmíněna výše, avšak my můžeme rovněž porovnat sílu TEF1 promotoru, jakožto vysoce expresně aktivního promotoru, se silou promotorů K1ORF2, jímž kontrolované transkripty obsahují na svém 5' konci v průměru 10 netemplátově přidaných adenosinových zbytků a naopak nenesou N⁷ methylguanosinovou čepičku, a K2ORF8, jímž kontrolované transkripty neobsahují na svém 5' konci netemplátově přidané adenosinové zbytky a naopak nesou N⁷ methylguanosinovou čepičku, z lineárních cytoplasmatických plasmidů pGKL. Po stanovení aktivity *Renilla* luciferázy, jejíž gen byl klonován právě pod kontrolu promotorů pocházejících z pGKL plasmidů, je možné říct, že ve srovnání s promotory TEF1 a PGK1 je aktivita promotorů K1ORF2 a K2ORF8 velmi nízká. Promotor TEF1 ovlivňuje expresi genu, jehož exprese je konstitutivní, což znamená, že je neustále potřeba jeho proteinový produkt. Dá se tedy předpokládat, že míra exprese genů pod jeho kontrolou bude větší než u promotorů pGKL plasmidů, které nekódují geny potřebné pro existenci celé buňky, ale pouze pro svůj vlastní prospěch. Výjimku by mohly představovat geny pro *killer* toxin a imunitu vůči němu, které jsou potřebné pro přežití celé buňky, jež tyto plasmidy nese, přičemž jsme pro tvorbu jedné reportérové kazety použili právě promotor kontrolující transkripci otevřeného čtecího rámce 2 z plasmidu pGKL1, který normálně kóduje podjednotky α a β *killer* toxinu, o kterém se dá předpokládat, že má stabilně vysokou expresi.

Je také možné srovnat sílu promotorů K1ORF2 a K2ORF8 mezi sebou podle aktivity *Renilla* luciferázy (**Obr. 49, 50**), exprese jejíhož genu byla kontrolovaná v případě jedné expresní kazety promotorem K1ORF2 a v druhém případě K2ORF8. Dle našich měření se zdá silnější promotor K1ORF2. V tomto případě byla míra jeho genové exprese výrazně vyšší než exprese promotoru K2ORF8, což se neslučuje se studií (Schickel *et al*, 1996). V této studii sledovali míru exprese reportérového genu enzymu glukóza-dehydrogenázy, který byl klonován pod kontrolu celkem sedmi UCS sekvencí pocházejících z pGKL plasmidů. UCS sekvence jsou *cis* regulační promotorové elementy vysoce důležité právě pro genovou expresi genů pGKL plasmidů a v principu odpovídají námi definované promotorové sekvenci daného otevřeného čtecího rámce. Podle této studie byla více exprimovaná glukóza-dehydrogenáza pod kontrolou promotoru UCS8, což odpovídá promotoru jako K2ORF8, než reportérový gen pod kontrolou UCS2 (tedy promotor K1ORF2). Ve výše zmíněné publikaci byla dále testována aktivita promotorů UCS1 (z plasmidu pGKL1), UCS2, 4, 5, 6, a 10 (z plasmidu pGKL2). Nejvyšší aktivitu vykazoval promotor UCS6 (K2ORF6) z plasmidu pGKL2. Tento promotor kontroluje

genovou expresi genu pro RNA polymerázu, která slouží výhradně k transkripci genů pGKL plasmidů. Je esenciální pro jejich existenci (Schaffrath *et al*, 1995). Nejslabším promotorem (cca 12x slabším než UCS6) byl UCS2 z plasmidu pGKL2. Tento promotor kontroluje genovou expresi genu pro DNA polymerázu plasmidu pGKL2 (Schickel *et al*, 1996).

Vysvětlení rozdílných výsledků získaných námi a těch, které byly popsány ve výše zmíněné studii (Schickel *et al*, 1996), a to, že promotor K1ORF2 je silnější, než K2ORF8 může být dáno tím, že nedošlo k správné přípravě reportéru 2 obsahujícího gen pro *Renilla* luciferázu pod kontrolou promotoru K2ORF8. Je možné, že stejně jako při neúspěšné přípravě reportéru 1/4 (viz kapitola 5.2.1), že dochází pouze k expresi genu pro hygromycinovou rezistenci, a to na úrovni potřebné pouze pro udržení rekombinantního plasmidu pGKL1 v buňce. Exprese genu pro *Renilla* luciferázu je pro buňku nepotřebná, a tudíž velmi nízká. Jak bylo dokázáno dříve (viz kapitola 2.1.3.1), určitý počet adenosinů na 5' konci transkriptů má pozitivní vliv na translaci, která je zvýšená (Bablanian *et al*, 1991, Gudkov *et al*, 2005).

Námi vytvořené reportérové kazety v pGKL plasmidech jsou velmi vhodným nástrojem pro studium síly všech promotorů pGKL plasmidů, či také jiných lineárně lokalizovaných elementů. Pomocí PCR reakce s vhodnými primery by bylo možné tyto sekvence jednoduše měnit a následně měřit aktivitu reportérového genu. Pro přesné stanovení množství vznikajících transkriptů by bylo rovněž vhodné provést Real-time PCR a množství vzniklých transkriptů porovnat s výslednou koncentrací proteinů.

7 SOUHRN

Hlavním cílem práce byla příprava reportérového systému, jež by umožnil studium iniciace translace transkriptů pocházejících z lineárních cytoplasmatických plasmidů kvasinky *Kluyveromyces lactis*.

- Podařilo se připravit duální kvasinkový plasmid, který nese dva reportérové geny pod kontrolou dvou rozdílných promotorů. Pomocí klonovací strategie za použití restričních endonukleáz se podařilo vytvořit plasmid pCEV-G1-G418-RLuc-FLuc. U tohoto připraveného plasmidu došlo k charakterizaci 5' konců transkriptů reportérových genů za použití metody 5' RACE PCR a stanovení místa transkripčního startu (TSS). Dále byla také určena síla promotorů kontrolujících expresi reportérových genů pomocí stanovení aktivit luciferázových reportérových genů

Finálním výsledkem je kvasinkový reportérový expresní plasmid pCEV-G1-G418-RLuc-FLuc s plně definovanými charakteristikami, jako je transkripční start a síla promotorů.

- Druhým cílem byla konstrukce reportérového systému, který je součástí plasmidu pGKL1. Zde jsme plánovali vytvoření dvou reportérových kazet.

Podařilo se ovšem připravit pouze první kazetu nesoucí reportérový gen? *Renilla* luciferázu, pod kontrolou promotoru iniciujícího vznik transkriptů s netemplátovou 5' polyadenylací a bez N⁷ methylguanosinové čepičky. Následně byla stanovena míra exprese reportérového genu a struktura 5' konců jeho transkriptů, kde byla ověřena jejich netemplátová polyadenylace.

Byla také připravena druhá kazeta, nesoucí reportérový gen pod kontrolou promotoru iniciujícího vznik transkriptů postrádajících 5' polyadenylaci, a naopak obsahujících N⁷ methylguanosinovou čepičku. Bohužel se nepotvrdila stability této reportérové kazety; i přes určitou míru exprese reportérového genu není kazeta plně funkční a bude muset být připravena znova

8 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. Ahn, B. Y., a Moss, B. (1989): Capped poly(A) leaders of variable lengths at the 50 ends of vaccinia virus late mRNAs. *J Virol*, 63: 226–232.
2. Altmann, M., Sonenberg, N., Trachsel, H. (1989): Translation in *Saccharomyces cerevisiae*: initiation factor 4E-dependent cell-free system. *Molecular and Cellular Biology*, (10):4467-72.
3. Bablanian, R., Goswami, S. K., Esteban, M., Banerjee, A. K., Merrick, W. C. (1991): Mechanism of selective translation of vaccinia virus mRNAs: differential role of poly(A) and initiation factors in the translation of viral and cellular mRNAs. *Journal of Virology*, 65(8): 4449-4460.
4. Baylis, S. A., Twigg, S. R., Vydelingum, S., Dixon, L. K., Smith, G. L. (1993): Three African swine fever virus genes encoding proteins with homology to putative helicases of vaccinia virus. *Journal of General Virology*, 74(9): 1969-1974.
5. Bergman, N., Moraes, K. C., Anderson, J. R., Zaric, B., Kambach, C., Schneider, R. J., Wilusz, C. J., Wilusz, J. (2007): Lsm proteins bind and stabilize RNAs containing 5' poly(A) tracts. *Nature Structural & Molecular Biology*, (9): 824-31.
6. Bertholet, C., Van Meir, E., Heggeler-Bordier, B., Wittek, R. (1987) Vaccinia virus produces late mRNAs by discontinuous synthesis. *Cell*, 50(2):153–162.
7. Boone, R. F. a Moss, B. (1977): Methylated 50-terminal sequences of vaccinia virus mRNA species made in vivo at early and late times after infection. *Virology*, 79: 67–80.
8. Bouveret, E., Rigaut, G., Shevchenko, A., Wilm, M., Séraphin, B. (2000) A Sm-like protein complex that participates in mRNA degradation. *The EMBO Journal*, 19(7): 1661-71.
9. Butler, A. R., White, J. H., a Stark, M. J. (1991): Analysis of the response of *Saccharomyces cerevisiae* cells to *Kluyveromyces lactis* toxin. *Journal of General Microbiology*, 137: 1749–1757.
10. Byrd, A. K., Raney, K. D. (2012): Superfamily 2 helicases. *Frontiers in Bioscience-Landmark*, 17: 2070-2088.
11. Ghosh, A., Lima, C. D. (2010): Enzymology of RNA cap synthesis. *Wiley Interdisciplinary Reviews. RNA*, 1(1): 152-172.
12. Gudkov, A. T., Ozerova, M. V., Shiryaev, V. M., a Spirin, A. S. (2005): 50-poly(A) sequence as an effective leader for translation in eukaryotic cell-free systems. *Biotechnology and Bioengineering*, 91: 468–473.

13. Güldener, U., Heck, S., Fielder, T., Beinhauer, J., a Hegemann, J. H. (1996): A new efficient gene disruption cassette for repeated use in budding yeast. *Nucleic Acids Research*, 24: 2519–2524.
14. Gunge, N., Tamaru, A., Ozawa, F., a Sakaguchi, K. (1981): Isolation and characterization of linear deoxyribonucleic acid plasmids from *Kluyveromyces lactis* and the plasmid-associated killer character. *Journal of Bacteriology*, 145: 382–390.
15. Gunge, N., Murata, K., Sakaguchi, K. (1982): Transformation of *Saccharomyces cerevisiae* with linear DNA killer plasmids from *Kluyveromyces lactis*. *Journal of Bacteriology*, 151(1): 462-464.
16. Gunge, N., a Yamane, C. (1984): Incompatibility of linear DNA killer plasmids pGKL1 and pGKL2 from *Kluyveromyces lactis* with mitochondrial DNA from *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology*, 159: 533–539.
17. Gunge, N. (1986): Linear DNA killer plasmids from the yeast *Kluyveromyces*. *Yeast*, 2(3): 153-162.
18. Gunge, N., Murakami, K., Takesako, T., Moriyama, H. (1990) Mating type locus-dependent stability of the *Kluyveromyces* linear pGKL plasmids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 6(5): 417-27.
19. Hänggi, M., Bannwarth, W., Stunnenberg, H. G. (1986): Conserved TAAAT motif in vaccinia virus late promoters: overlapping TATA box and site of transcription initiation. *The EMBO Journal*, 5(5):1071-6.
20. Hassett, D. E., Lewis, J. I., Xing, X., DeLange, L., Condit, R. C. (1997): Analysis of a temperature-sensitive vaccinia virus mutant in the viral mRNA capping enzyme Isolated by clustered charge-to-alanine mutagenesis and transient dominant selection. *Virology*, 238(2): 391-409.
21. Hausmann, S., Vivares, C. P., Shuman, S. (2002): Characterization of the mRNA Capping Apparatus of the Microsporidian Parasite *Encephalitozoon cuniculi*. *Journal of Biological Chemistry*, 277(1): 96-103.
22. He, W., a Parker, R. (2001): The yeast cytoplasmic LsmI/Pat1p complex protects mRNA 3' termini from partial degradation. *Genetics*, 158(4): 1445-55.
23. Hinnebusch, A. G. (2014): The scanning mechanism of eukaryotic translation initiation. *Annual Review of Biochemistry*, 83: 779-812.
24. Hishinuma, F., Nakamura, K., Hirai, K., Nishizawa, R., Gunge, N., and Maeda, T. (1984): Cloning and nucleotide sequences of the linear DNA killer plasmids from yeast. *Nucleic Acids Research*, 12: 7581–7597.

25. Ink, B. S., Pickup, D. J. (1990): Vaccinia Virus directs the synthesis of early mRNAs containing 5' poly(A) sequences. *Proceedings of National Academy of Science of the U S A*, 87(4): 1536–1540.
26. James, P., Halladay, J., Craig, E. A. (1996): Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics*, 144(4): 1425–1436.
27. Jeske, S., Meinhardt, F., a Klassen, R. (2007): Extranuclear inheritance: Virus-Like DNA-Elements in Yeast. *In: Progress in Botany*, (eds.) Esser, K., Löttge, U., Beyschlag, W., a Murata, J., (Berlin: Springer), 98–129.
28. Jung, G. H., Leavitt, M. C., a Ito, J. (1987): Yeast killer plasmid pGKL1 encodes a DNA polymerase belonging to the family B DNA polymerases. *Nucleic Acids Research*, 15: 9088.
29. Kempken, F., Hermanns, J., Osiewacz, H. D. (1992): Evolution of linear plasmids. *Journal of Molecular Evolution*, 35(6): 502–513.
30. Kikuchi, Y., Hirai, K., Hishinuma, F. (1984): The yeast linear DNA killer plasmids, pGKL1 and pGKL2, possess terminally attached proteins. *Nucleic Acids Research*, 12(14): 5685–5692.
31. Kikuchi, Y., Hirai, K., Gunge, N., Hishinuma, F. (1985): Hairpin plasmid — a novel linear DNA of perfect hairpin structure. *The EMBO Journal*, 4(7): 1881–1886.
32. Kitada, K., Gunge, N. (1988): Palindrome-hairpin linear plasmids possessing only a part of the ORF1 gene of the yeast killer plasmid pGKL1. *Molecular & General Genetics*, 215(1): 46–52.
33. Klassen, R., Tontsidou, L., Larsen, M., Meinhardt, F. (2001): Genome organization of the linear cytoplasmic element pPE1B from *Pichia etchellsii*. *Yeast*, 18(10): 953–961.
34. Lane, W. J., Darst, S. A. (2010): Molecular evolution of multisubunit RNA polymerases: structural analysis. *Journal of Molecular Biology*, 395(4): 686–704.
35. Larsen, M., Gunge, N., and Meinhardt, F. (1998): *Kluyveromyces lactis* killer plasmid pGKL2: evidence for a viral-like capping enzyme encoded by ORF3. *Plasmid*, 40: 243–246.
36. Lu, J., Huang, B., Esberg, A., Johansson, M. J., Byström, A. S. (2005): The *Kluyveromyces lactis* gamma-toxin targets tRNA anticodons. *RNA (New York, N. Y.)*, (11):1648–54.
37. Mašek, T., Vopálenský, V., Suchomelová, P., Pospíšek, M. (2005): Denaturing RNA electrophoresis in TAE agarose gels. *Analytical Biochemistry*, 336(1): 46–50.

38. McNeel, D. G., a Tamanai, F. (1991): Terminal region recognition factor 1, a DNA-binding protein recognizing the inverted terminal repeats of the pGK1 linear DNA plasmids. *Proceedings of National Academy of Science of the U S A*, 88: 11398–11402.
39. Mulder, J., Robertson, M. E., Seamons, R. A., a Belsham, G. J. (1998): Vaccinia virus protein synthesis has a low requirement for the intact translation initiation factor eIF4F, the cap-binding complex, within infected cells. *Journal of Virology*, 72: 8813–8819.
40. Nagashima, K., Kasai, M., Nagata, S., Kaziro, Y. (1986): Structure of the two genes coding for polypeptide chain elongation factor 1 alpha (EF-1 alpha) from *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*, 45(3): 265-73.
41. Patel, D. D., Pickup, D. J., Joklik, W. K. (1986): Isolation of cowpox virus A-type inclusions and characterization of their major protein component. *Virology*, 149(2):174-89.
42. Patel, D. D., a Pickup, D. J. (1987): Messenger RNAs of a strongly-expressed late gene of cowpox virus contain 50-terminal poly(A) sequences. *The EMBO Journal*, 6: 3787–3794.
43. Rathjen, J., Mellor, J. (1990): Characterisation of sequences required for RNA initiation from the PGK promoter of *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Research*, 18(11): 3219-25.
44. Partow, S., Siewers, V., Bjørn, S., Nielsen, J., Maury, J. (2010): Characterization of different promoters for designing a new expression vector in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 27(11): 955-64.
45. Plucienniczak, A., Schroeder, E., Zettlmeissl, G., Streeck, R. E. (1985): Nucleotide sequence of a cluster of early and late genes in a conserved segment of the vaccinia virus genome. *Nucleic Acids Research*, 13(3):985-98.
46. Romanos, M. A., a Boyd, A. (1988): A transcriptional barrier to expression of cloned toxin genes of the linear plasmid k1 of *Kluyveromyces lactis*: evidence that native k1 has novel promoters. *Nucleic Acids Research*, 16: 7333–7350.
47. Ruprich-Robert, G., Thuriaux, P. (2010): Non-canonical DNA transcription enzymes and the conservation of two-barrel RNA polymerases. *Nucleic Acids Research*, 38(14): 4559-4569.
48. Satwika, D., Klassen, R., Meinhardt, F. (2012): Anticodon nuclease encoding virus-like elements in yeast. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 96(2): 345-356.
49. Shirokikh, N. E., a Spirin, A. S. (2008): Poly(A) leader of eukaryotic mRNA bypasses the dependence of translation on initiation factors. *Proceedings of National Academy of Science of the U S A*, 105: 10738–10743.

50. Schaffrath, R., a Meacock, P. A. (1995): Kluyveromyces lactis killer plasmid pGKL2: molecular analysis of an essential gene, ORF5. *Yeast*, 11: 615–628.
51. Schaffrath, R., Meinhardt, F., a Meacock, P. A. (1997): ORF7 of yeast plasmid pGKL2: analysis of gene expression in vivo. *Current Genetics*, 31: 190–192.
52. Schaffrath, R., a Meacock, P. A. (2001): An SSB encoded by and operating on linear killer plasmids from Kluyveromyces lactis. *Yeast*, 18: 1239–1247.
53. Schickel, J., Helmig, C., a Meinhardt, F. (1996): Kluyveromyces lactis killer system: analysis of cytoplasmic promoters of the linear plasmids. *Nucleic Acids Research*, 24: 1879–1886.
54. Schrunder, J., a Meinhardt, F. (1995): An extranuclear expression system for analysis of cytoplasmic promoters of yeast linear killer plasmids. *Plasmid*, 33: 139–151.
55. Schwer, B., Visca, P., Vos, J. C., a Stunnenberg, H. G. (1987): Discontinuous transcription or RNA processing of vaccinia virus late messengers results in a 50 poly(A) leader. *Cell*, 50: 163–169.
56. Schwer, B., a Stunnenberg, H. G. (1988): Vaccinia virus late transcripts generated in vitro have a poly(A) head. *The EMBO Journal*, 7: 1183–1190.
57. Shuman, S. (1995): Capping enzyme in eukaryotic mRNA synthesis. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, 50: 101-29.
58. Shuman, S. a Schwer, B. (1995): RNA capping enzyme and DNA ligase: a superfamily of covalent nucleotidyl transferases. *Molecular Microbiology*, 17(3): 405-10.
59. Sor, F., Wésolowski, M., Fukuhara, H. (1983): Inverted terminal repetitions of the two linear DNA associated with the killer character of the yeast Kluyveromyces lactis. *Nucleic Acids Research*, 11(15):5037-44.
60. Sor, F., a Fukuhara, H. (1985): Structure of a linear plasmid of the yeast Kluyveromyces lactis; compact organization of the killer genome. *Current Genetics*, 9: 147–155.
61. Stam, J. C., Kwakman, J., Meijer, M., a Stuitje, A. R. (1986): Efficient isolation of the linear DNA killer plasmid of Kluyveromyces lactis: evidence for location and expression in the cytoplasm and characterization of their terminally bound proteins. *Nucleic Acids Research*, 14: 6871–6884.
62. Stark, M. J., a Boyd, A. (1986): The killer toxin of Kluyveromyces lactis: characterization of the toxin subunits and identification of the genes which encode them. *The EMBO Journal*, 5: 1995–2002.

63. Stark, M. J., Mileham, A. J., Romanos, M. A., a Boyd, A. (1984): Nucleotide sequence and transcription analysis of a linear DNA plasmid associated with the killer character of the yeast *Kluyveromyces lactis*. *Nucleic Acids Research*, 12: 6011–6030.
64. Stark, M. J. R., Boyd, A., Mileham, A. J., a Romanos, M. A. (1990): The plasmid-encoded killer system of *Kluyveromyces lactis*: a review. *Yeast*, 6: 1–29.
65. Sýkora, M. (2013): Charakterizace transkripčního aparátu lineárních plasmidů kvasinky *Kluyveromyces lactis*. *Univerzita Karlova v Praze, Praha*.
66. Sýkora, M., Pospíšek, M., Novák, J., Mrvová, S., Krásný, L., a Vopálenský, V. (2018): Transcription apparatus of the yeast virus-like elements: architecture, function, and evolutionary origin. *PLoS Pathogens*, 14(10): e1007377.
67. Takeda, M., Hiraishi, H., Takesako, T., Tanase, S., and Gunge, N. (1996): The terminal protein of the linear DNA plasmid pGKL2 shares an N-terminal domain of the plasmid-encoded DNA polymerase. *Yeast*, 12: 241–246.
68. Tharun, S., He, W., Mayes, A. E., Lennertz, P., Beggs, J. D., Parker, R. (2000) Yeast Sm-like proteins function in mRNA decapping and decay. *Nature*, 404(6777): 515-8.
69. Tharun, S., Muhlrads, D., Chowdhury, A., Parker, R. (2005): Mutations in the *Saccharomyces cerevisiae* LSM1 gene that affect mRNA decapping and 3' end protection. *Genetics*, 170(1):33-46.
70. Tiggemann, M., Jeske, S., Larsen, M., a Meinhardt, F. (2001): *Kluyveromyces lactis* cytoplasmic plasmid pGKL2: heterologous expression of Orf3p and proof of guanylyltransferase and mRNA-triphosphatase activities. *Yeast*, 18: 815–825.
71. Tommasino, M., Ricci, S., a Galeotti, C. L. (1988): Genome organization of the killer plasmid pGK12 from *Kluyveromyces lactis*. *Nucleic Acids Research*, 16: 5863–5878.
72. Tommasino, M. (1991): Killer system of *Kluyveromyces lactis*: the open reading frame 10 of the pGK12 plasmid encodes a putative DNA binding protein. *Yeast*, 7: 245–252.
73. Ustyantsev, I. G., Golubchikova, J. S., Borodulina, O. R. a Kramerov, D. A. (2017): Canonical and noncanonical RNA polyadenylation. *Molecular biology*, 51: 226-236.
74. Vopálenský, V. (2007): Role 5' koncových struktur u eukaryotických mRNA. Dizertační práce, *Univerzita Karlova v Praze, Praha*.
75. Vopálenský, V., Sýkora, M., Mašek, T., Pospíšek, M. (2019): Messenger RNAs of yeast virus-like elements contain non-templated 5' poly(A) leaders, and their expression is independent of eIF4E and Pab1. *Frontiers in Microbiology*, 10: 2366.

76. Wei, C. M., a Moss, B. (1974): Methylation of newly synthesized viral messenger RNA by an enzyme in vaccinia virus. *Proceedings of National Academy of Science of the U S A*, 71: 3014–3018.
77. Wilson, D. W., a Meacock, P. A. (1988): Extranuclear gene expression in yeast: evidence for a plasmid-encoded RNA polymerase of unique structure. *Nucleic Acids Research*, 16: 8097–8112.
78. Xia, X., MacKay, V., Yao, X., Wu, J., Miura, F., Ito, T. (2011): Translation initiation: a regulatory role for poly(A) tracts in front of the AUG codon in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 189: 469–478.
79. Yang, Z., Reynolds, S. E., Martens, C. A., Bruno, D. P., Porcella, S. F., Moss, B. (2011): Expression profiling of the intermediate and late stages of poxvirus replication. *Journal of Virology*, 85(19): 9899-9908.
80. Zhang, Z., Dietrich, F. S. (2005): Mapping of transcription start sites in *Saccharomyces cerevisiae* using 5' SAGE. *Nucleic Acids Research*, 33(9): 2838-51.